

Prokoagulatorisches Potential von Thrombozytenapheresekonzentraten während einer Lagerungsdauer von sieben Tagen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Judith Friedrich

geboren am 10.12.1982 in Greifswald

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Barz, Jena
2. Prof. Dr. A. Hochhaus, Jena
3. Prof. Dr. P. Hellstern, Ludwigshafen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2011

Meinen Eltern gewidmet
DANKE!

Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Acid-Citrat-Dextrose A
ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
CD	Cluster of differentiation
CFT	Clot Formation Time
CT	Clotting Time
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FL	Fluorescent Light
FSC	Forward Scatter
GP	Glykoprotein
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
Hz	Hertz
MCF	Maximal Clot Firmness
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNS	mitochondriale Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
nM	Nanomol
PAR	Protease-Activated-Receptor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PS	Phosphatidylserin
SSC	Sideward Scatter
TAK	Thrombozytenapheresekonzentrat
TF	Tissue Factor

TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGA	Thrombin Generation Assay
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	ultraviolett
vWF	von-Willebrand-Faktor
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
2	Einleitung	9
2.1.	Klinische Notwendigkeit der Substitution von Thrombozyten	9
2.2.	Herstellung und Lagerung von TAK	10
2.3.	Die zellulären Komponenten der Gerinnung und die Bedeutung der Thrombozyten	11
2.4.	Grundlagen der plasmatischen Gerinnung	15
2.5.	Auswirkungen der Lagerung auf TAK	19
3	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	23
4	Material und Methoden.....	25
4.1.	Herstellung und Lagerung der TAK	25
4.2.	Vorbereitung der Proben für die Untersuchungen	25
4.2.1.	Probenherstellung für die Rotationsthrombelastometrie und Bestimmung der Thrombozytenkonzentration	27
4.2.2.	Herstellung der Proben für die Durchflusszytometrie	27
4.2.3.	Herstellung der Proben für die Thrombinmessung	27
4.3.	Messungen mit der Rotationsthrombelastometrie	28
4.4.	Durchflusszytometrische Messungen	34
4.5.	Bestimmung der Thrombinbildung	36
4.6.	Statistik	39
5	Ergebnisse.....	41
5.1.	Entwicklung der Thrombozytenkonzentration	41
5.2.	Ergebnisse der rotationsthrombelastometrischen Messungen	43
5.2.1.	Item-Messung	43
5.2.2.	Extem-Messung	45
5.2.3.	Fibtem-Messung	47

5.2.4.	Auswirkungen verschiedener Einflussfaktoren	49
5.3.	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen	51
5.4.	Ergebnisse des Thrombin Generation Assay	52
6	Diskussion.....	53
6.1.	Entwicklung der Thrombozytenkonzentration	54
6.2.	Veränderung globaler Gerinnungsparameter	55
6.3.	Freisetzung von Mikrovesikeln während der Lagerung	63
6.4.	Diskussion der Thrombinbildung	66
7	Schlussfolgerung.....	69
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Anhang.....	80

1 Zusammenfassung

Thrombozytenkonzentrate dürfen in Deutschland vor einer Transfusion höchstens vier Tage gelagert werden. Da ihre Herstellung teuer ist und Versorgungsengpässe auftreten, wäre eine längere Lagerungsdauer zur maximalen Ausnutzung wünschenswert. Einschränkend sind dabei einerseits eine mögliche bakterielle Kontamination und andererseits eine eventuelle Abnahme des prokoagulatorischen Potentials der Thrombozytenkonzentrate. Hinsichtlich der bakteriellen Verunreinigung gibt es vielversprechende Entwicklungen der Pathogeninaktivierung. Damit tritt die Frage nach Lebens- und Funktionsfähigkeit der Thrombozyten weiter in den Vordergrund.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Gerinnungsfähigkeit von über sieben Tage gelagerten Thrombozytenkonzentraten mit verschiedenen *in-vitro*-Methoden und Bestimmung ihres prokoagulatorischen Potentials im Lagerungsverlauf. Die Konzentrate wurden mit apheretischen Verfahren hergestellt und an den Tagen null, vier und sieben vermessen.

Im Mittelpunkt stand dabei die Rotationsthrombelastometrie, die einen Globaltest der Gerinnung darstellt und die Zeiten bis zur Gerinnselbildung sowie die Festigkeit des Gerinnsels darstellt. Zusätzlich untersuchten wir Plasmaproben, die aus den gelagerten TAK gewonnen wurden, mit der Durchflusszytometrie auf die Anzahl freigesetzter Mikrovesikel sowie ihre Thrombingenerierungsfähigkeit mit Hilfe eines TGA. Außerdem wurde die Thrombozytenkonzentration im Lagerungsverlauf bestimmt. Diese Messungen fanden ebenfalls an Proben der Tage null, vier und sieben statt.

Unsere Studie zeigt, dass während der Lagerung Veränderungen in den TAK auftraten. Dabei blieb die Thrombozytenkonzentration konstant. Veränderungen in der Rotationsthrombelastometrie wurden vor allem zum

Ende der Lagerungsdauer signifikant. Längere Zeiten bis zum Erreichen einer bestimmten Gerinnselfestigkeit (CT und CFT) und eine abnehmende Gerinnselfestigkeit (MCF) sprechen für ein reduziertes prokoagulatorisches Potential der TAK.

Die Durchflusszytometrie weist auf eine Mikrovesikelbildung in den TAK hin, die im Lagerungsverlauf deutlich zunahm. Diese ist als Folge der Aktivierung der Plättchen anzusehen.

Im TGA gab es zwischen den Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der Thrombinbildung. Dieser Test zeigt vor allem Veränderungen der plasmatischen Gerinnung, weshalb auf geringe Veränderungen im Lagerungsmedium rückgeschlossen werden kann.

Da die Thrombozytenzahl in den TAK nicht signifikant abnahm, müssen die beobachteten Veränderungen durch funktionelle oder morphologische Beeinträchtigungen der Thrombozyten bedingt sein.

Eine wesentliche Ursache liegt in der Aktivierung von Plättchen. Schon im Herstellungsprozess sind sie künstlichen Oberflächen und Scherstress ausgesetzt, die eine Aktivierung bewirken können. Während der Lagerung setzt sich diese fort. Deutlich wird die Aktivierung in der zunehmenden Freisetzung von Mikrovesikeln.

Die konstante Thrombinproduktion im Plasma während der Lagerung zeigt die untergeordnete Bedeutung von Veränderungen im Lagerungsmedium.

Bis zum zweiten Messzeitpunkt am vierten Tag blieben prokoagulatorische Eigenschaften der TAK weitgehend erhalten. Zum Ende der Lagerungsdauer traten hingegen deutliche Veränderungen auf. Damit ist eine Verlängerung der Lagerungsdauer nicht empfehlenswert.

2 Einleitung

2.1. Klinische Notwendigkeit der Substitution von Thrombozyten

TAK werden in der modernen Medizin in vielfältiger Weise sowohl zur Prävention als auch zur Therapie von Hämorrhagien angewandt. Eine Störung der Gerinnung kann plasmatisch oder thrombozytär bedingt sein, wobei hier Thrombozytopenien von Thrombozytopathien unterschieden werden.

Thrombozytopenien können durch Störungen der Thrombozytenproduktion, der –verteilung und des –abbaus entstehen.

Bei malignen Erkrankungen und unter Zytostatikatherapie ist die Hämatopoese beeinträchtigt. Verteilungsstörungen treten z. B. Splenomegalie auf. Einen gesteigerten Abbau oder Verbrauch findet man bei Disseminierter Intravaskulärer Koagulation oder bei Bildung von Antikörpern gegen Thrombozyten, wie sie bei der Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie, nach Transfusionen oder Medikamenteneinnahme auftreten können (Kiefel 2003). Zudem nimmt die Thrombozytenzahl durch den Blutverlust bei chirurgischen Eingriffen und Traumata ab.

Thrombozytopathien sind angeboren wie die Thrombasthenie Glanzmann oder erworben z. B. durch Medikamentennebenwirkungen. Außerdem treten sie in Folge von Erkrankungen wie dem Plasmozytom und bei Urämie auf.

Bei der Substitution von Thrombozyten unterscheidet man prophylaktische Transfusionen zur Vermeidung von Blutungen von therapeutischen Transfusionen nach Eintritt einer Blutung. Die Notwendigkeit der Plättchensubstitution wird durch die Thrombozytenkonzentration im Blut des Patienten bestimmt. Allerdings ist diese als Prädiktor für eine Blutung umstritten (Friedmann et al. 2002). Je nach Studie und zu Grunde

liegender Erkrankung werden unterschiedliche Grenzwerte vorgeschlagen, die von >5.000 Thrombozyten/ μl bei onkologischen Erkrankungen über >50.000 Thrombozyten / μl bei chirurgischen Eingriffen bis zu >100.000 Thrombozyten / μl bei akuten Blutungen (Heal und Blumberg 2004, Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats Hrsg. 2008) reichen.

Eine Überprüfung der Effektivität der Transfusion erfolgt bei Blutungen durch Bewertung des klinischen Zustandes des Patienten und bei prophylaktischen Transfusionen durch den Anstieg der Thrombozytenkonzentration.

2.2. Herstellung und Lagerung von TAK

Für die Produktion von TAK gibt es zwei Methoden. Man kann Vollblut zentrifugieren und dadurch die Plättchen vom Rest der Blutbestandteile trennen (buffy coat). Mehrere blutgruppenidentische Präparate werden anschließend zu einem Pool-Thrombozytenpräparat verarbeitet. Die zweite Möglichkeit ist die Anwendung von Aphereseverfahren. Während im ersten Fall mehrere Vollblutspenden aufbereitet werden, ist bei der Apherese ein einzelner Spender direkt mit einem Zellseparator verbunden. In diesem werden die Zellfraktionen ebenfalls durch Zentrifugation getrennt. Man unterscheidet diskontinuierliche Verfahren, bei denen dem Spender jeweils eine kleine Blutmenge entnommen, verarbeitet und zurückgeführt wird, von kontinuierlichen Verfahren. Bei der kontinuierlichen Apherese fließt fortwährend Blut durch den Separator, Zellen werden extrahiert und der Spender bekommt die Erythrozyten und Leukozyten kontinuierlich wieder zugeführt (Müller-Eckardt und Kiefel 2003). Die Thrombozyten werden zusammen mit Plasma in einem Kunststoffbeutel gesammelt. Die Konzentration der Plättchen muss dabei mindestens 2×10^{11} pro Transfusionseinheit betragen (Vorstand der Bundesärztekammer auf

Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats Hrsg. 2008). Zur Verhinderung einer Koagulation setzt man dem Konzentrat das Antikoagulanzen ACD-A zu.

Die Lagerung erfolgt bei 22°C +/- 2°C auf einem Thrombozyten-Agitator. Um die Übertragung von Krankheiten zu vermeiden, wird ein Screening von Spenderblut auf Humanes-Immundefizienz-Virus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Treponemen und Cytomegalievirus-IgG durchgeführt. Zudem legt man von Stichproben der TAK Blutkulturen an, um bakterielle Kontaminationen zu erfassen. Wenn Verunreinigungen auftreten, können die Fälle zurückverfolgt, Fehlerquellen gefunden und beseitigt werden.

Jährlich werden im Institut für Transfusionsmedizin in Jena 8.500 bis 9000 TAK produziert, von denen etwa 95% transfundiert werden. Die Kosten für ein Konzentrat betragen ca. 550 Euro.

2.3. Die zellulären Komponenten der Gerinnung und die Bedeutung der Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Abschnürungen von Megakaryozyten des Knochenmarks mit einer mittleren Überlebenszeit von zehn Tagen. Etwa ein Drittel der Gesamtmenge ist in der Milz gespeichert. Bei einem gesunden Individuum liegt die Plättchenkonzentration zwischen 150 und 400 Thrombozyten/nl (Müller-Eckardt und Kiefel 2003).

Der Thrombozyt ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in der sich Glykoproteine und -lipide befinden. Diese sogenannte Glykokalix enthält Membranproteine, die als Oberflächenantigene wirken und für die Funktion der Plättchen essentiell sind. Dazu gehören Kollagenrezeptoren wie das GP Ia/IIa und VI (Clemetson und Clemetson 2001). Ein ebenfalls wichtiger Bestandteil ist der Glykoproteinkomplex Ib/V/IX, der an den vWF bindet und die Aktivierung durch Thrombin vermittelt (Berndt et al. 2001). Eine wesentliche Rolle in der Aggregation spielt zudem der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa (Payrastre et al. 2000).

Für den Erhalt der diskoiden Form der Thrombozyten befinden sich submembranös angeordnete zirkuläre Mikrotubuli und Aktinfilamente. Die Aktinfilamente sind mit den GP Ia, Ib und IX verbunden und verhindern eine Exozytose der Thrombozytengranula im inaktiven Zustand (Fox 2001).

Bei den Granula unterscheidet man dichte Körperchen (dense bodies), alpha-Granula und lysosomale Granula. Die dense bodies enthalten ADP, Serotonin und Kalzium. In den alpha-Granula sind unter anderem Adhäsionsproteine (vWF und Fibrinogen), Gerinnungsfaktoren (Faktor V und Faktor XIII), Faktoren der Fibrinolyse (Plasminogen), Wachstumsfaktoren (PDGF), beta-Thrombomodulin und Plättchenfaktor 4 gespeichert. Die Granulamembran hat als wichtige Bestandteile P-Selektin sowie die GP IIb/IIIa und IV. Die lysosomale Granula enthält hydrolytische Enzyme (Kehrel 2003, Harrison und Cramer 1993).

Die Plasmamembran der Plättchen besitzt verzweigte Kanäle, das sogenannte surface connected system, das als Membranreservoir beim Formwandel der Thrombozyten dient (Morgenstern 2010).

Unter physiologischen Bedingungen fließt der Hauptteil der Plättchen inaktiviert durch den Kreislauf. Dies ändert sich bei einer Verletzung der Gefäßwand. Es kommt zur Vasokonstriktion und durch Adhäsion von Plättchen zur Bildung eines primären Plättchenpfropfes. Die Plättchen präsentieren eine prokoagulatorische Oberfläche und setzen Granula frei. Beides zusammen ermöglicht die Aggregation der Plättchen und den Ablauf der plasmatischen Gerinnung mit Bildung eines festen Thrombus.

Bei einem Schaden der Gefäßwand wird dem vorüberfließenden Blut subendotheliales Gewebe ausgesetzt. Dieses enthält Moleküle, an die Thrombozyten binden können. Das ermöglicht die Adhäsion der Plättchen. Eine wichtige Rolle spielt Kollagen, das vom Subendothel präsentiert wird. Bei niedrigem Scherstress z. B. bei offenen Wunden kann es mit den

GP Ia/IIa und VI der Thrombozyten interagieren (Clemetson und Clemetson 2001). Wenn im Gefäß hingegen hoher Scherstress auftritt, bindet vor allem der vWF, der als Plasmaprotein im Blut zirkuliert, an das Kollagen. Er wird dann auch als immobilisierter vWF bezeichnet und stellt eine weitere Adhäsionsmöglichkeit für die Thrombozyten dar. An ihn kann das GP Ib aus dem Glykoproteinkomplex Ib/V/IX der Plättchen binden (Farndale et al. 2004). Andere Adhäsivproteine mit einer untergeordneten Bedeutung sind Laminin, Fibulin und Thrombospondin sowie Fibrinogen und Fibronektin (Ruggeri und Mendolicchio 2007).

Neben der Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand sind die Adhäsionsmoleküle, vor allem Kollagen und immobilisierter vWF, für die Aktivierung von Thrombozyten wichtig (Savage et al. 1992). Weitere Substanzen wie Thrombin und Thromboxan A₂ führen ebenfalls zur Aktivierung. Außerdem spielen die Faktoren ADP, Serotonin, Adrenalin, MMP-2, Immunkomplexe, Komplementfaktoren, Vasopressin, Plasmin, gewebspezifischer Plasminogenaktivator und Streptokinase eine Rolle bei der Plättchenaktivierung (Kehrel 2003).

Bis auf das Kollagen, das an spezifische Rezeptoren bindet, wirken die Moleküle an Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind. Die Folge beider Vorgänge ist ein Anstieg der Kalziumkonzentration im Thrombozyten (Müller-Eckardt 2003).

Neben diesen physiologischen Aktivatoren gibt es auch eine artifizielle Aktivierung der Plättchen. Diese tritt bei erhöhtem Scherstress, Temperaturschwankungen und Kontakt mit künstlichen Oberflächen auf.

Die Folgen der Aktivierung sind vielfältig. Der erhöhte Kalziumspiegel führt zu Veränderungen im Zytoskelett des Thrombozyten. Aktin- und Myosin-filamente lagern sich zusammen und bewirken eine Zentralisierung der Zellorganellen. Der Thrombozyt verliert seine diskoide Form, wird spheroid und bildet Pseudopodien aus. Mikrovesikel werden abgeschnürt.

Eine weitere Folge der Aktivierung ist die Sekretion der Granula. Aus den dense bodies werden als wichtige Verstärker der Aktivierung ADP sowie ATP und Serotonin, das auch als Vasokonstriktor wirkt, sezerniert. Die Sekretion der alpha-Granula führt zur Freisetzung von Adhäsionsproteinen (Fibrinogen, vWF) und Gerinnungsfaktoren (Faktor V). Außerdem gelangen Bestandteile der Granulamembran an die Plättchenoberfläche. Dazu gehört das P-Selektin sowie GP IIb/IIIa und IV (Harrison und Cramer 1993).

Durch Aktivierung des Plättchens wird das GP IIb/IIIa in seiner Konformation geändert. Damit kann es Fibrinogen binden und auf diese Weise zur Adhäsion der Thrombozyten beitragen. Zusätzlich erwirbt es die Fähigkeit auch lösliches Fibrinogen zu binden, an das sich weitere Plättchen anlagern können (Payrastre et al. 2000). Diesen Vorgang der Aneinanderlagerung von Plättchen bezeichnet man als Aggregation.

Nach der Aktivierung exprimiert der Thrombozyt TF (Panés et al. 2007). Dieser wird auch an anderen Orten z. B. dem Subendothel präsentiert und hat eine zentrale Bedeutung bei der Initiierung der plasmatischen Gerinnung.

Außerdem verändert sich die Phospholipidzusammensetzung der Thrombozytenmembran. Der Vorgang wird von Enzymen reguliert, deren Aktivität sich bei einem Anstieg der Kalziumkonzentration ändert. Die Folge ist ein Verlust der Membranasymmetrie mit Verlagerung von PS an die Außenseite der Plättchenmembran. Dies wird als Flip-Flop-Mechanismus bezeichnet (Piccin et al. 2007).

Das PS ist ein anionisches Phospholipid. Die Oberfläche der Thrombozyten wirkt durch diese negativen Ladungen prokoagulatorisch, denn über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen können sich Gerinnungsfaktoren anlagern. Das betrifft die aktivierten Faktoren X und IX mit den Cofaktoren V und VIII und ihr Substrat Faktor X (Dahlbäck

2005). Sie bilden den Prothrombinase- bzw. Tenasekomplex, die durch die negativ geladenen Phospholipide eine für ihre Funktion optimale räumliche Anordnung einnehmen. Das heißt, dass die Wege von Substraten und Produkten zwischen den Reaktionskomplexen besonders kurz sind (Heemskerk et al. 2002). Durch die Bindung an die Thrombozytenmembran wird zudem eine hohe Konzentration der Faktoren am Ort der Gerinnung und Thrombenbildung erreicht. Außerdem sind die Faktoren V und VIII durch die Zusammenlagerung im Prothrombinase- bzw. Tenasekomplex vor Inhibition durch Protein C geschützt. Die Bindung von Faktor X verhindert eine Inaktivierung durch TFPI oder Antithrombin (Dahlbäck 2008). Diese Wechselwirkungen zeigen die enge Verknüpfung des Gerinnungsvorgangs zwischen Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung.

Eine weitere Folge der erhöhten Kalziumkonzentration bei Aktivierung ist die Abschnürung von Mikrovesikeln (Comfurius 1990). Von aktivierten Thrombozyten freigesetzte Mikrovesikel haben ähnliche Eigenschaften wie die Plättchen selbst. Sie besitzen Plasma- und Membranproteine, die denen der Plättchen entsprechen. Dadurch wirken auch sie prokoagulatorisch. Die Mikrovesikel ermöglichen Plättchen-Plättchen- und Plättchen-Subendothel-Interaktionen (Merten et al. 1999). Außerdem enthält die Mikrovesikelmembran einen hohen Anteil PS (Freyssinet und Toti 2010). Wie bei den Thrombozyten können sich an diese negativ geladenen Oberflächen Gerinnungsfaktoren anlagern.

2.4. Grundlagen der plasmatischen Gerinnung

Über viele Jahre wurde die plasmatische Gerinnung als eine Kaskade oder Wasserfall von Faktoren betrachtet, die sich nacheinander aktivieren. Diese Sichtweise geht auf zwei Arbeitsgruppen in den 60er Jahren zurück (Macfarlane 1964, Davie und Ratnoff 1964). In den folgenden Jahren entwickelte man das Modell einer extrinsisch oder intrinsisch aktivierten

Gerinnung, die in einer gemeinsamen Endstrecke resultiert. Heute geht man von einem zellgebundenen System aus. Dabei sind die beiden klassischen Aktivierungspfade eng miteinander verknüpft (Monroe und Hoffman 2006).

Der plasmatische Gerinnungsvorgang gliedert sich in drei Phasen, die initiale Thrombinbildung, die Verstärkungsphase und die Ausbreitung der Thrombinbildung. Sie laufen am Endothel bzw. am Thrombozyten ab.

Auslöser der Aktivierung des Gerinnungsvorgangs ist eine Verletzung der Gefäßwand. Dadurch gelangt TF in Kontakt mit Blut. TF ist ein Transmembranprotein, das konstitutiv auf vielen extravaskulären Zellen exprimiert wird, jedoch nicht auf intaktem Gefäßendothel (Drake et al. 1989). Im Blut befindet sich der aktivierte plasmatische Gerinnungsfaktor VIIa in geringer Konzentration (Lippi et al. 2009). Der TF und Faktor VIIa bilden einen Komplex. Diesen Vorgang betrachtete man als Auslöser der extrinsischen Gerinnung. Heute wird seine Bedeutung noch viel zentraler eingeschätzt. Der Komplex ist in der Lage durch Autoaktivierung Faktor VII in den aktiven Faktor VIIa zu überführen. Außerdem aktiviert er am Endothel geringe Mengen von Faktor X und Faktor IX (Dahlbäck 2005).

Faktor X bindet an seinen Cofaktor FV. Dieser entstammt zu 20% der alpha-Granula aktivierter Plättchen und zu 80% dem Plasma, wo er durch Faktor X oder Thrombin aktiviert wird (Huang und Koerper 2008). Zusammen mit Kalzium und Phospholipiden bilden Faktor X und Faktor V den Prothrombinasekomplex. Der Prothrombinasekomplex führt zur Bildung geringer Mengen Thrombin. Damit ist die Phase der initialen Thrombinbildung am Endothel abgeschlossen (Abb.1).

Besondere Bedeutung kommt der lokalen Beschränkung des Gerinnungsvorgangs zu. Faktor X, der sich nicht mehr auf der Zelloberfläche befindet, wird von TFPI oder Antithrombin inaktiviert. Damit wird eine Thrombenbildung an anderen Stellen verhindert (Dahlbäck 2008).

Der Vorgang der Aktivierung und gleichzeitiger Inaktivierung der Gerinnung findet fortwährend statt. Deshalb sind im Blut niedrige Spiegel von aktivierten Gerinnungsfaktoren und freigesetzten Mikrovesikeln vorhanden (Berckmans et al. 2001). Zur Gerinnung kommt es jedoch nicht, da Plättchen und der Komplex aus Faktor VIII und vWF nicht aktiviert sind.

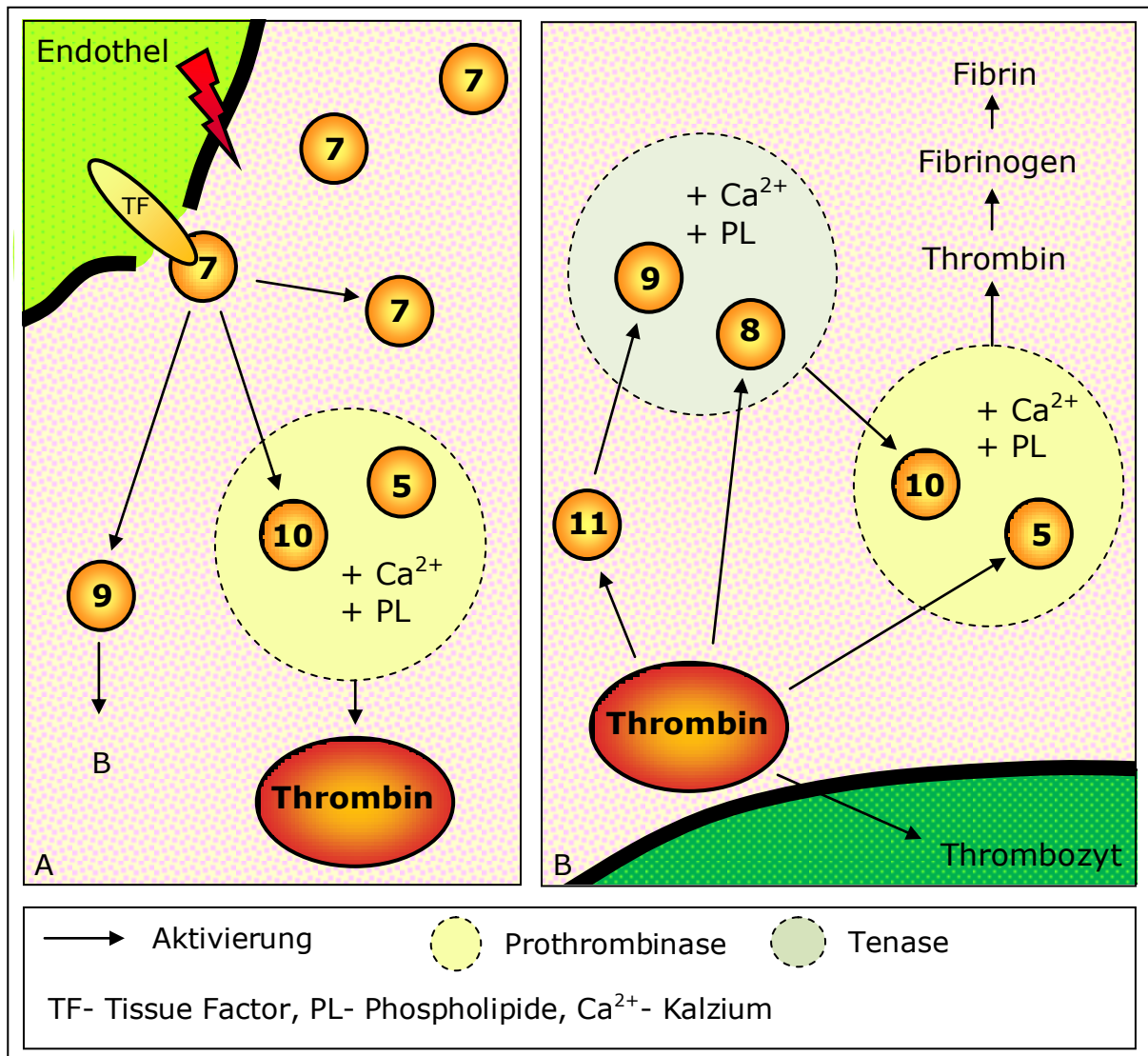


Abb. 1: Gerinnung: A) Phase der initialen Thrombinbildung am Endothel
B) Phase der Verstärkung und Propagation

Es folgt die Phase der Verstärkung der Thrombinbildung. Während dieser Phase verlagert sich der Ort der Reaktion von den TF-tragenden Zellen des Subendothels zu den Thrombozyten.

An der Gefäßwand adhärierte Plättchen werden durch das initial gebildete Thrombin über PAR und GP Ib aktiviert. Das Thrombin stellt einen besonders starken Aktivierungsreiz dar. Anionische Phospholipide gelangen an die äußere Membran des Thrombozyten. Sie sind mit ihren negativen Ladungen essentiell für die Funktion des Prothrombinase- und Tenasekomplexes.

Außerdem werden durch das Thrombin die Cofaktoren dieser Komplexe aktiviert. Faktor V wird zu aktiviertem Faktor Va. Faktor VIII ist im Plasma unter anderem zum Schutz vor Proteolyse durch Protein C und Antithrombin an den vWF gebunden. Diese Bindung wird durch Thrombin und Faktor X gespalten, wodurch dem vWF die Adhäsion ermöglicht und Faktor VIII aktiviert wird (Fay 2004). Zudem wird durch Thrombin Faktor XI aktiviert, der zusätzlich Faktor IX bereitstellt (Oliver et al. 1999). Faktor IX, Faktor VIII, Kalzium und Phospholipide bilden den Tenasekomplex, der zur weiteren Aktivierung von Faktor X führt. Die Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung wird hauptsächlich vom Tenasekomplex bestimmt (Bode 2006, Dahlbäck 2005).

In der Verstärkungsphase werden damit die Faktoren, die klassisch der intrinsischen Gerinnung zugerechnet werden (Faktoren XI, IX und VIII), aktiviert. Diese wiederum führen zur Aktivierung von Faktor X und damit der Bildung des Prothrombinasekomplexes (Abb. 1).

Deutlich wird, dass intrinsischer und extrinsischer Pfad aus dem klassischen Modell eng miteinander verwoben sind. Früher postulierte Aktivatoren der intrinsischen Gerinnung wie Faktor XII, HMWK und Präkallikrein führen zu einer Beeinflussung von oberflächenaktivierten Koagulationsuntersuchungen *in vitro*. Allerdings haben Mängel dieser Faktoren keine Blutung zur Folge (Gailani und Renné 2007).

Während der Propagationsphase findet eine massive Thrombinbildung statt. Dabei werden die Prozesse der Verstärkungsphase fortgesetzt. Der Komplex aus Faktor IX und Faktor VIII unterstützt die Bildung von Faktor X auf den Plättchen. Dort bildet Faktor X mit Faktor V, Phospholipiden und

Kalzium den Prothrombinasekomplex und führt zu starker Thrombinbildung (Monroe et al. 2002).

Das Thrombin hat neben vielen anderen Funktionen Fibrinogen als Substrat. Es entsteht Fibrin. Außerdem aktiviert es Faktor XIII, der das Fibrin durch Transpeptidierungen quervernetzt.

Das Resultat des Zusammenspiels aus plasmatischer Gerinnung und Eigenschaften von Thrombozyten, Endothel und Mikrovesikeln ist ein stabiler Thrombus.

2.5. Auswirkungen der Lagerung auf TAK

TAK dürfen in Deutschland bis zur Transfusion maximal vier Tage gelagert werden (Vorstand der Bundesärztekammer Hrsg. 2010). Die ersten Thrombozytentransfusionen fanden in den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts statt. Allerdings gab es in den damaligen Konzentraten metabolische Veränderungen wie einen abnehmenden pH-Wert und schwankende Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke. Es erfolgte die Entwicklung modifizierter Lagerungsbeutel, die sauerstoffdurchlässig waren sowie eine Anpassung des Beutelvolumens und der Agitation. Man optimierte die Lagerungsbedingungen entscheidend durch eine Festlegung der Lagerungstemperatur auf 22°C (Murphy et al. 1970). Diese Verbesserungen ermöglichten ab 1981 eine Lagerung der TAK in den USA über fünf Tage. In Studien wurden neue Plastikbeutel für die Lagerung untersucht. Dabei unterschied sich die Zirkulationsdauer von Thrombozyten nach Transfusion, die fünf bzw. sieben Tage in unterschiedlichen Kunststoffbeuteln gelagert wurden, nicht signifikant (Simon et al. 1983). Deshalb wurde die zulässige Lagerungsdauer zwischen 1984 und 1986 auf sieben Tage verlängert. Der Grund für die erneute Verkürzung auf fünf und seit diesem Jahr auf vier Tage war die erhöhte Inzidenz von Fällen bakterieller Verunreinigung. Neue Methoden des Screenings auf Bakterienbesiedlung und der Pathogeninaktivierung

(Dreier et al. 2008, Müller et al. 2006, Blajchmann et al. 2005, Seghatchian und de Sousa 2006) stellen jedoch eine zukunftsweisende Methode dar, um die bakterielle Kontamination in den Hintergrund treten zu lassen. So dürfen in Schweden während des Auftretens von Versorgungsengpässen auch über sieben Tage gelagerte Konzentrate transfundiert werden (Shanwell et al. 2006). Die Frage nach der Qualität und damit die Fähigkeit gelagerter Plättchenkonzentrate die Hämostase des Patienten zu verbessern, rückt damit zunehmend in den Mittelpunkt und ist Gegenstand vieler Studien.

Um die Veränderungen der Konzentrate während der Lagerung zu untersuchen, muss man *in-vitro*-Versuche von *in-vivo*-Versuchen an gesunden bzw. kranken Probanden unterscheiden.

Bei *in-vitro*-Untersuchungen der Morphologie von TAK stellten mehrere Untersucher fest, dass die Plättchenzahl ebenso wie das mittlere Plättchenvolumen konstant bleiben (Tynngård et al. 2008, Rock et al. 2006). Allerdings verlieren bis zu 45% der Plättchen ihre diskoide Form, bilden Pseudopodien aus und verlagern ihre Granula nach zentral (Rinder und Ault 1998, Cardigan und Williamson 2003).

Auch die Stoffwechselvorgänge verändern sich während der Lagerung. Die anaerobe Energiegewinnung durch die Glykolyse produziert Laktatsäure, die zu einem Abfall des pH-Wertes führt. Moderne Lagerungsmaterialien und -bedingungen reduzieren diese Vorgänge. Der pH-Wert bleibt in den geforderten Grenzwerten von 6,4-7,8 erhalten (Vorstand der Bundesärztekammer Hrsg. 2010). Kritische ATP-Level werden nicht unterschritten. Das gleiche gilt für die Grenzwerte für den Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck und die Laktat- und Glukosekonzentration (Tynngård et al. 2008, Svendsen et al. 2007, Gullikson 2003, Shanwell et al. 2006). Außerdem bleibt die Fähigkeit der Thrombozyten über ihre mRNS Proteine zu synthetisieren erhalten (Thon et al. 2008).

Für die Adhäsion der Plättchen an die defekte Gefäßwand, an andere Zellen sowie weitere Plättchen sind verschiedene Oberflächenproteine erforderlich. Während der Lagerung finden hier Veränderungen statt, die die Fähigkeit der Plättchen zur Adhäsion einschränken. So wird eine proteolytische Spaltung des GP Ib/V/IX-Komplexes, an den unter anderem der vWF bindet, festgestellt. Die Folge ist eine verminderte Konzentration auf der Thrombozytenmembran (Cauwenberghs et al. 2007). Die Adhäsion an Kollagen ist ebenfalls reduziert (Boomgaard et al. 1994). Im Gegensatz dazu scheint die GP IIb/IIIa-Expression während der Lagerung stabil zu sein (Metcalf et al. 1997, Ferrer et al. 2000) bzw. zuzunehmen (Thon und Devine 2007). Allerdings nimmt die Fähigkeit Fibrinogen zu binden ab (Lozano et al. 1997).

Eine wesentliche Ursache für die beschriebenen Phänomene ist die Aktivierung der Plättchen, welche auch während der Lagerung stattfindet. Erkennbar ist dies durch die abnehmende Konzentration von alpha-Granula im Plasma im Lagerungsverlauf. Die Expression von P-Selektin an der Plättchenoberfläche steigt durch Verschmelzen der Granulamembran mit der Thrombozytenmembran (Holme et al. 1997, Leytin et al. 2004). Zudem findet eine Veränderung der Phospholipidzusammensetzung der Membran statt. Dabei steigt der Anteil an PS in der äußeren Thrombozytenmembran (Lai et al. 2002).

Während der Lagerung nimmt die Aktivierbarkeit der Plättchen gegenüber Agonisten ab. Das zeigt sich an einer reduzierten Kalziumfreisetzung und sinkender Menge an mobilisierbarem Kalzium im Blutplättchen (Rinder und Ault 1998). Kalzium vermittelt einen Großteil der zellulären Effekte und nimmt damit eine zentrale Position ein. Außerdem sind die P-Selektin-Expression und die GP IIb/IIIa-Aktivierung nach Einwirken von Agonisten reduziert. Bei längerer Lagerungsdauer lösen einige Agonisten nur eine reduzierte Aktivierung des Thrombozyten aus. Dazu gehören Thrombin, ADP, Adrenalin und Kollagen (Curvers et al. 2004, Lozano et al. 1997).

Während der Lagerung werden als Folge der Aktivierung mit einem Anstieg der Kalziumkonzentration Mikrovesikel freigesetzt, die in dieser Arbeit als Aktivierungsmarker eingesetzt wurden.

In-vivo-Untersuchungen von Thrombozytenkonzentraten stellen hauptsächlich die Wiederfindungsrate (recovery) und die Überlebenszeit (survival) dar. Beide Größen sinken im Verlauf der Lagerung (Dumont et al. 2002, Shanwell et al. 2006, Slichter et al. 2006). Ob die Clearance der Thrombozyten im menschlichen Körper durch die Lagerung verändert wird, ist fraglich. Es gibt Hinweise, dass die erhöhte P-Selektin- und GPIIb-Expression durch Vermittlung von Adhäsionskontakten zu Leukozyten und Endothelzellen die Clearance erhöhen. Die Expression von P-Selektin ermöglicht die Bindung von Plättchen an den PSGL-1-Rezeptor der Neutrophilen. Das an der Oberfläche der Thrombozyten exprimierte PS führt anschließend zur Internalisierung des Plättchens (Maugeri et al. 2009).

Insgesamt bleibt trotz dieser Studien unklar, wie sich die Gerinnungsfähigkeit der TAK während der Lagerung verändert. Hier setzt unsere Studie an, die mit der Rotationsthrombelastometrie als Globaltest der Gerinnung die TAK in ihren Eigenschaften näher charakterisiert. Die Untersuchung der Mikrovesikelbildung gibt weitere Aufschlüsse über Veränderungen während der Lagerung. Schließlich zeigt die Thrombinbildung bei nicht vorhandenen Thrombozyten mögliche plättchenunabhängige Veränderungen im Plasma. Es ergeben sich Hinweise auf eine ideale Lagerungsdauer mit einem maximalen klinischen und ökonomischen Nutzen.

3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Zurzeit dürfen TAK in Deutschland vor einer Transfusion maximal vier Tage gelagert werden. Die Produktionskosten für die TAK sind hoch und gerade in Ferienzeiten können durch eine geringere Anzahl an Spendern Versorgungsengpässe entstehen. Deshalb wäre es vorteilhaft, wenn die Produkte auch noch nach einer längeren Lagerungsdauer transfundiert werden können. Allerdings kann durch eine längere Lagerung die Qualität der TAK abnehmen. In dieser Arbeit nutzten wir verschiedene *in-vitro*-Methoden, um den Zusammenhang von Lagerung und Qualität der Konzentrate hinsichtlich ihres Beitrags zur Gerinnung zu untersuchen.

1. Entwicklung der Thrombozytenkonzentration während der Lagerung

Zunächst bestimmten wir die Thrombozytenkonzentration der Präparate im Verlauf der Lagerung. Ein Abfall derselben ist mit einer abnehmenden Qualität gleichzusetzen.

2. Messung der globalen Gerinnungsparameter mittels Rotations-thrombelastometrie

Es folgte die Messung mit der Rotationsthrombelastometrie mit den drei Tests intem, extem und fibtem. Dabei untersucht der intem-Test vor allem den intrinsischen Anteil der Gerinnung, der extem-Test den extrinsischen Anteil der Gerinnung und der fibtem-Test die Gerinnungsleistung ohne den Einfluss der Thrombozyten. Die Messungen fanden an den Tagen null, vier und sieben statt. Unser Ziel war es herauszufinden, ob sich die Gerinnungsfähigkeit der TAK, die sich in den vier Parametern CT, CFT, MCF und dem alpha-Winkel widerspiegelt, im zeitlichen Verlauf ändert. Dabei hat eine abnehmende Gerinnungsleistung eine zunehmende CT und CFT, eine abnehmende MCF und einen abnehmenden alpha-Winkel zur Folge.

3. Bestimmung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten durch Messung der Anzahl der Mikrovesikel

Die Freisetzung von Mikrovesikeln findet während der Hämostase durch die Aktivierung von Plättchen statt. Demzufolge müsste sich eine Aktivierung der Thrombozyten während der Lagerung in einer ansteigenden Anzahl an Mikrovesikeln zeigen. Zur Bestimmung der Anzahl von Mikrovesikeln führten wir durchflusszytometrische Messungen durch. Die Untersuchung erfolgte an Plasmaproben der TAK, die an den Tagen null, vier und sieben hergestellt wurden.

4. Messung der Thrombinbildung im Plasma

Schließlich untersuchten wir Plasmaproben der drei Messzeitpunkte auf ihre Fähigkeit zur Thrombinbildung mit einem TGA. Hiermit evaluierten wir Veränderungen, die im Lagerungsmedium auftreten können. Dazu gehören Auswirkungen der Mikrovesikelkonzentration und Veränderungen der plasmatischen Gerinnung während der Lagerung. Eine Abnahme der Thrombinbildung zeigt eine abnehmende Gerinnungsfähigkeit des Plasmas. Eine konstante Thrombinproduktion deutet hingegen auf geringe Veränderungen im Lagerungsmedium hin.

4 Material und Methoden

4.1. Herstellung und Lagerung der TAK

Die TAK wurden von regulären Spendern des Instituts für Transfusionsmedizin in Jena mit dem Apheresegerät Trima accel der Caridian BCT produziert. Hierbei wurde das Konzentrat kontinuierlich gewonnen und zusammen mit Plasma im Lagerungsbeutel CitrofleX® B-6 gelagert.

Die Auswahl der Spender erfolgte nach den Vorgaben der Bundesärztekammer und den Empfehlungen des Robert-Koch-Institutes.

Es wurde, abhängig von den Voraussetzungen des Spenders, ein Einzel- oder Doppelkonzentrat hergestellt. Als AntikoagulanZ wurde ACD-A verwendet. Das Zielvolumen der TAK lag bei 250 ml. Wir untersuchten 48 Proben.

Die TAK wurden über sieben Tage auf dem Thrombozytenschüttelgerät LPR1 eltreSt bei 50 Hz und einer Temperatur von 22°C +/- 2°C gelagert.

4.2. Vorbereitung der Proben für die Untersuchungen

Von den TAK entnehmen wir zunächst mit Hilfe des Sterilschweißgerätes Terumo SC-201A TSCD eine Probe von 30 ml TAK in einen CompofleX® Transferbag (150 ml) von Fresenius HemoCare. Das Ausgangskonzentrat wurde wieder auf dem Agitator gelagert.

Aus dem Transferbeutel füllten wir zwei Zentrifugenröhrchen (13 ml) von Sarstedt mit TAK. Eines der beiden Röhrchen wurde mehrmals zentrifugiert.

Zunächst erfolgte die Zentrifugation über 5 min bei 4000 U/min. Anschließend wurde der Überstand mit 4000 U/min über 20 min zentrifugiert (Abb.2). Die korpuskulären Blutbestandteile des TAK bildeten einen Niederschlag.

Der Überstand aus Blutplasma wurde in zwei Kryoröhrchen der Greiner Bio-One GmbH zu jeweils 2 ml abgefüllt und bei -80°C eingefroren. Sie stellen das Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Anzahl der Mikrovesikel mit der Durchflusszytometrie und den TGA dar.

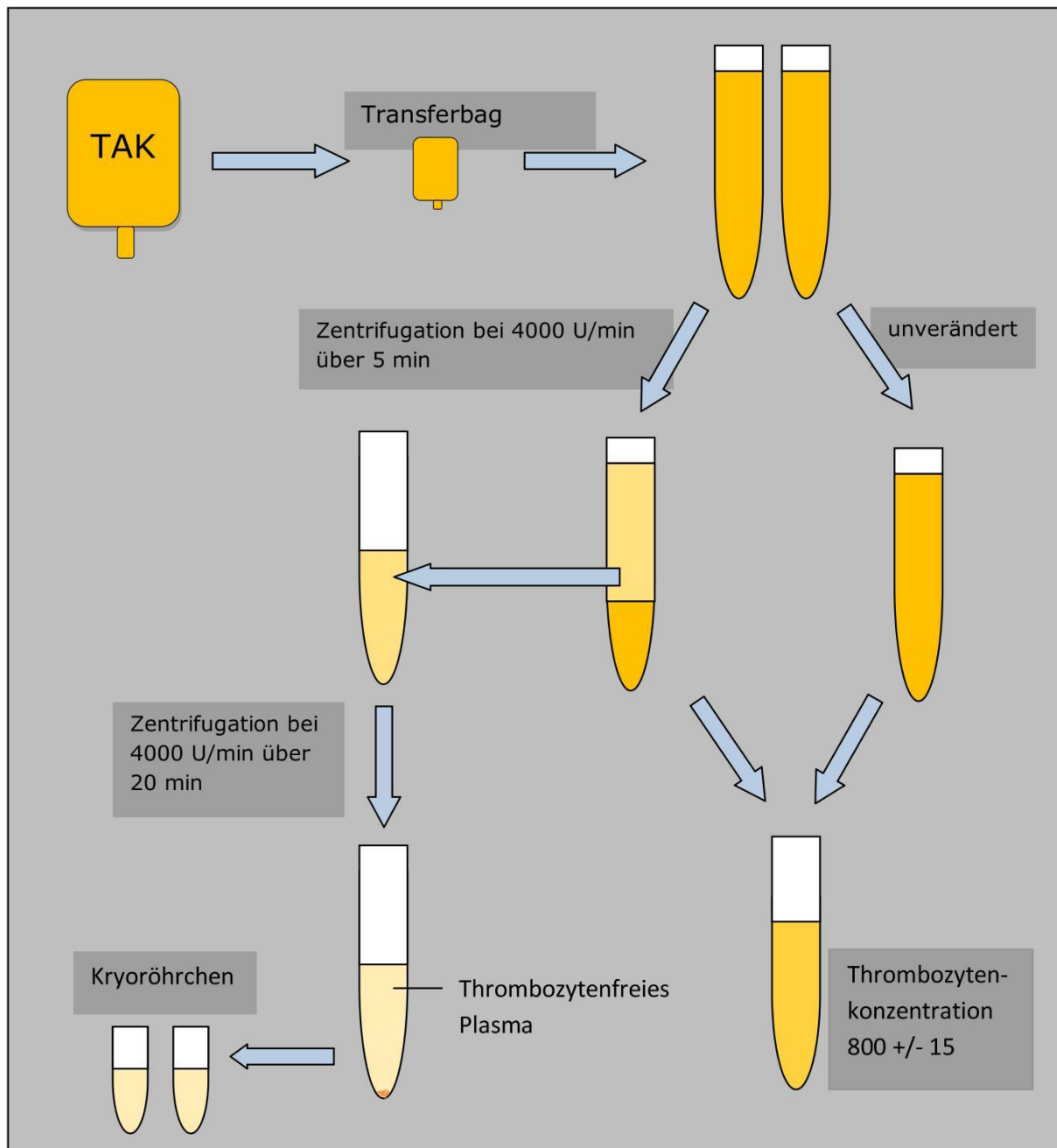


Abb. 2: Herstellung der Proben mit den verschiedenen Zentrifugationsschritten

4.2.1. Probenherstellung für die Rotationsthrombelastometrie und Bestimmung der Thrombozytenkonzentration

Ein Teil der Probe aus dem Zentrifugenröhrchen, das lediglich einmal für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert wurde, verwendeten wir zur Verdünnung des unveränderten TAK. Dazu wurde der Inhalt beider Röhrchen im Blutbildautomat Sysmex KX-21N von Sysmex Deutschland GmbH auf die Thrombozytenkonzentration untersucht. Danach erfolgte die Herstellung einer Probe, die eine Thrombozytenkonzentration von 800 ± 15 Thrombozyten/nl enthielt. Dazu wurde der Inhalt der Zentrifugenröhrchen in einem geeigneten Verhältnis in ein neues Röhrchen pipettiert. Diese Probe wurde für die Rotationsthrombelastometrie verwendet. Das Vorgehen ermöglichte von der Thrombozytenkonzentration unabhängige Untersuchungen der TAK.

4.2.2. Herstellung der Proben für die Durchflusszytometrie

Wir tauten für jedes Ausgangs-TAK eine Plasmaprobe der Tage null, vier und sieben auf. Jeweils 300 µl wurden in Eppendorf tubes (1,5 ml) pipettiert. Danach erfolgte das Abzentrifugieren eventuell noch vorhandener Thrombozyten. Dazu wurde jede Probe bei 13.000 U/min über 10 min mit der Zentrifuge Biofuge pico Heraeus zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200 µl in ein Reagenzglas BD Falcon™ Polystyrene Round-Bottom Tube (5 ml) gegeben und mit 3 µl des Antikörpers CD-61-PE von Immunotech versetzt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei Raumtemperatur und zum Schutz des Fluorophors im Dunkeln inkubiert.

4.2.3. Herstellung der Proben für die Thrombinmessung

Für die Thrombinmessung wurde das zweite Kryoröhrchen aufgetaut und war dann für die Untersuchungen verwendbar.

4.3. Messungen mit der Rotationsthrombelastometrie

Die klassische Thrombelastographie wurde 1948 von Hartert entwickelt. Sie ermöglichte die Erfassung des gesamten Gerinnungsvorgangs vom Beginn der Gerinnungsbildung über die vollständige Ausprägung bis zur Fibrinolyse.

Bei der klassischen Thrombelastographie ragte ein Stempel in eine beweglich gelagerte Küvette. In die Küvette wurde das Untersuchungsmaterial, zumeist natives Vollblut, pipettiert und am Thrombelastographen installiert. Es erfolgte eine kontinuierliche Auslenkung der Küvette in einem geringen Winkel. Zunächst geschah dies ohne Widerstand. Durch die ablaufende Gerinnung bildeten sich Fibrinfäden. Diese Fibrinbildung erschwerte im Verlauf der Messung die Auslenkung und wurde in einer Gerinnungskurve optisch aufgezeichnet (Hartert 1951).

In den 90er Jahren erfuhr die klassische Thrombelastographie eine Weiterentwicklung. Es wurde eine unbewegliche Küvette zusammen mit einem auslenkbaren Stempel eingeführt. Dadurch konnte die Stoßempfindlichkeit der Methode deutlich gesenkt werden (Ebinger 2008). Zudem wurden verschiedene Gerinnungsaktivatoren entwickelt, die kürzere Untersuchungszeiten und damit schnellere Ergebnisse lieferten. Je nach verwendetem Gerät spricht man heute von Rotationsthrombelastographie/roTEG® (Haemoscope Corporation) oder Rotationsthrombelastometrie/ROTEM® (Pentapharm GmbH).

In unseren Versuchen nutzten wir das ROTEM® delta der Pentapharm GmbH. Dieses Gerät besitzt vier Messkanäle, in denen die Untersuchungen zeitgleich ablaufen können (Abb. 3).

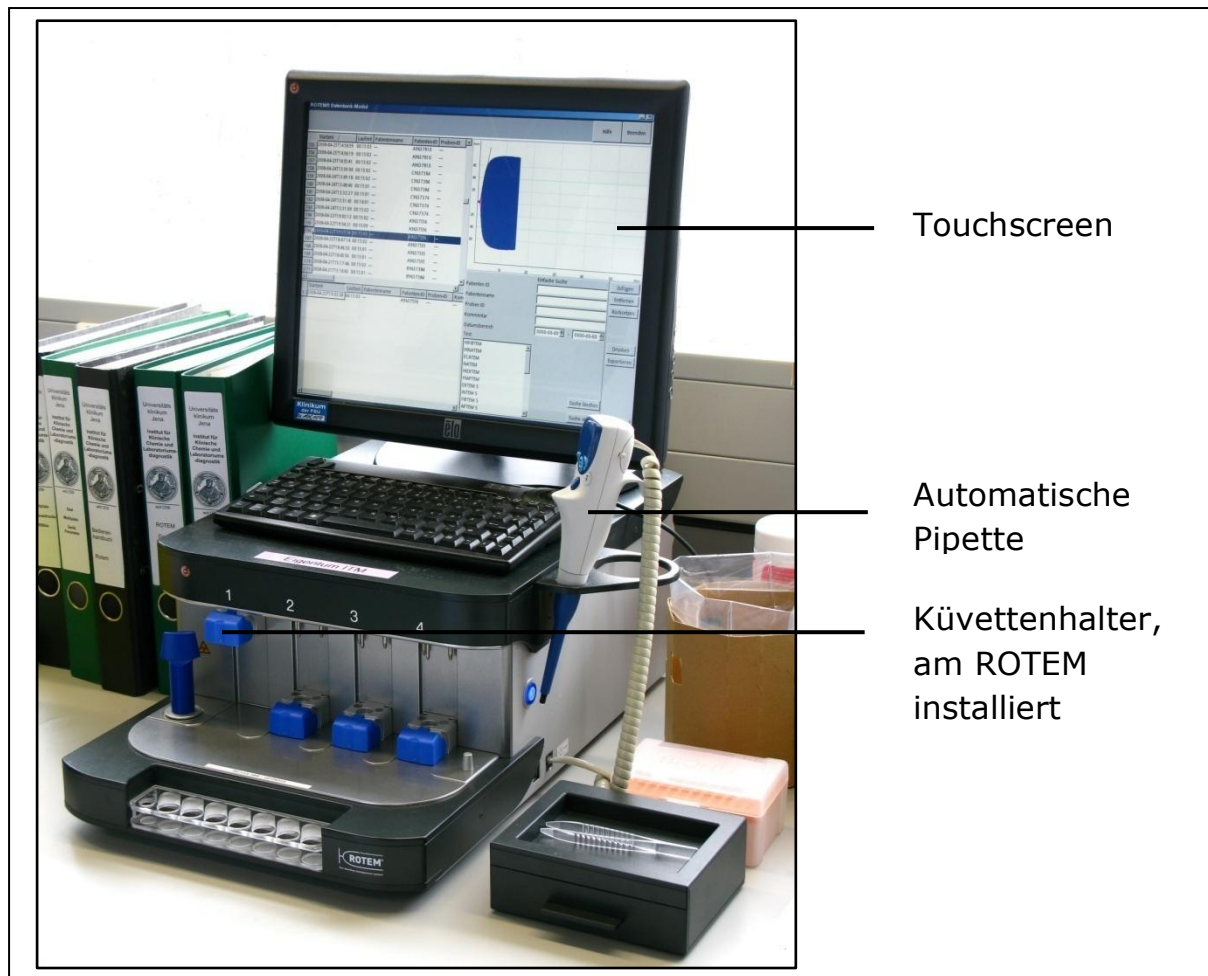


Abb. 3: ROTEM delta® der Pentapharm GmbH

In der Vorbereitungsphase wurden die Küvettenhalter auf die beheizte Oberfläche des ROTEM gestellt. Dies gewährleistete eine konstante Untersuchungstemperatur von 37°C. Außerdem wurden Plastikküvetten für einmaligen Gebrauch in den Küvettenhaltern und Plastikstempel an den Metallstiften des ROTEM angebracht.

Mittels einer automatischen Pipette pipettierten wir zunächst die Startreagenzien (s. u.) und anschließend 300 µl des vorbereiteten TAK in die Küvette. Mit der Zugabe der Probe begann der Gerinnungsvorgang, weshalb die Küvette zügig am ROTEM installiert werden musste. Erleichtert wurde die exakte Positionierung mittels Küvettenhalter, die über Führungsstäbe an die richtige Stelle geschoben wurden. Dadurch

ragte der zylindrische Stempel genau in der Mitte der Küvette in die Probe. Dieser Stempel wurde durch eine Feder um $4,75^\circ$ nach rechts und links mit einer Frequenz von 10/min ausgelenkt. Dabei wurde die Rotation des Stempels optisch mit einer Lichtquelle, einem Spiegel und einem Lichtsensor detektiert. Das Signal gelangte in Echtzeit an den angeschlossenen Computer und wurde mit der integrierten ROTEM-Software ausgewertet (Abb. 4).

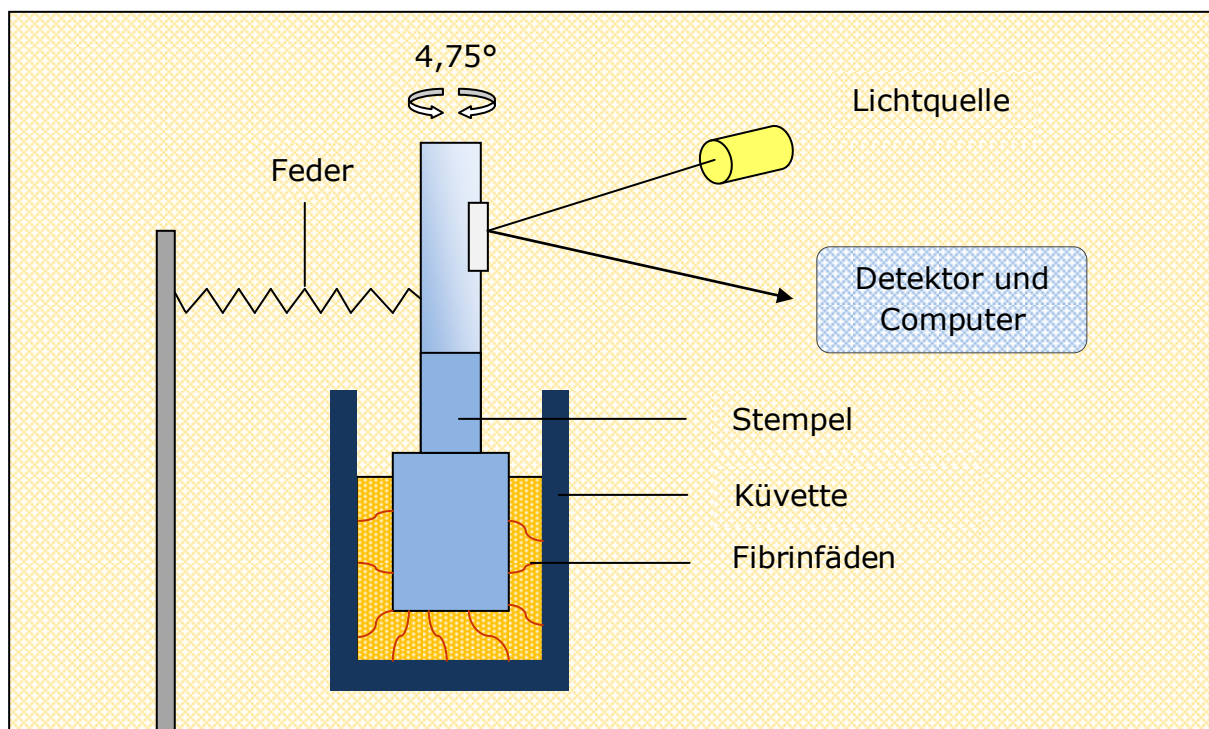


Abb. 4: Funktionsweise ROTEM

Vor dem Beginn der Gerinnung konnte die Bewegung des Stempels ungehindert stattfinden. Das änderte sich durch die Ausbildung von Fibrinfäden zwischen Küvette und Stempel. Je größer und fester das Gerinnsel wurde, umso mehr schränkte es die Bewegung des Stempels ein. Aus der Rotationsfähigkeit des Stempels und ihrer Einschränkung im zeitlichen Verlauf wurde mit der ROTEM-Software das entsprechende Rotationsthrombelastogramm erstellt. Dabei entsprach die anfängliche Linie von 0 mm einer ungehinderten Rotationsmöglichkeit des Stempels.

Die Fibrinbildung mit Zunahme der Gerinnselfestigkeit führte zu einer größeren Amplitude der Kurve. Der theoretisch mögliche Wert von 100mm entsprach einem nicht mehr beweglichen Stempel (Abb. 5).

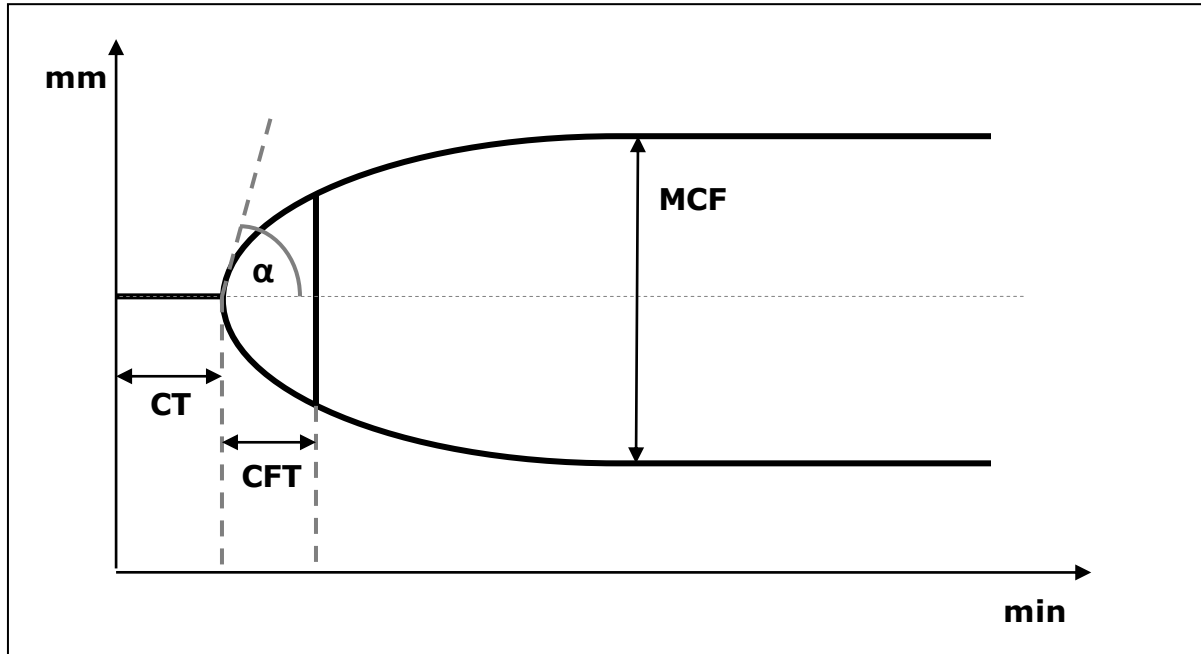


Abb. 5: Rotationsthrombelastogramm

Für unsere Messungen waren die Parameter CT, CFT, MCF und der alpha-Winkel entscheidend.

- Die CT stellt die Dauer bis zum sichtbaren Beginn der Gerinnung dar. Der Beginn ist dabei als eine Gerinnselfestigkeit von 2 mm definiert.
- Die CFT gibt den Zeitraum zwischen Beginn der Gerinnung und einer Gerinnselfestigkeit von 20 mm an.
- Die maximale Gerinnselfestigkeit wird durch die MCF wiedergegeben.
- Der alpha-Winkel zeigt die Kinetik der Gerinnselbildung.

Mit der Rotationsthrombelastometrie können unterschiedliche Tests durchgeführt werden. Je nach Fragestellung enthalten die Untersuchungsreagenzien verschiedene Gerinnungsaktivatoren bzw. Gerinnungs-

inhibitoren. In unseren Versuchen wendeten wir die drei Tests intem, extem und fibtem an.

Alle Messungen liefen über 15 min und wurden an den Tagen null, vier und sieben von allen TAK durchgeführt. Damit wurde der Prozess vom Beginn bis zur maximalen Ausprägung der Gerinnungsbildung erfasst.

Reagenzien und ihre Inhaltsstoffe für die Rotationsthrombelastometrie von Pentapharm GmbH im Überblick:

- star-Tem[®]: Kalziumchlorid
- ex-Tem[®]: Tissue Factor
- in-Tem[®]: partielles Thromboplastin (Phospholipide) und Ellagsäure (negativ geladene Oberflächen)
- fib-Tem[®]: Cytochalasin D als Thrombozyteninhibitor und Kalziumchlorid

Bei jedem Test versetzten wir 300 µl unserer Probe mit 20 µl der entsprechenden Reagenzien. Nach 15 min wurden die Messungen gestoppt und die CT, CFT, MCF und der alpha-Winkel bestimmt.

Intem-Messung:

Zu unserer Probe gaben wir ein Gemisch aus Startreagenz (star-Tem[®]), welches die Rekalzifizierung der Probe bewirkt und in-Tem[®], welches partielles Thromboplastin und negativ geladene Oberflächen enthält und das intrinsische System aktiviert. Somit können anhand dieses Tests vor allem Aussagen über Faktoren des klassisch intrinsischen Systems wie die Faktoren XII, XI, VIII und IX gewonnen werden.

In der Klinik wird dafür die Bestimmung der aPTT genutzt. Zu einer Plasmaprobe werden partielles Thromboplastin und Oberflächenaktivatoren hinzugefügt. Allerdings liefert die Rotationsthrombelastometrie im Vergleich zur aPTT nicht nur die Zeit bis zur

Gerinnselfbildung, sondern zusätzlich Informationen über den Verlauf der Gerinnselfbildung und die Gerinnselffestigkeit.

Extem-Messung:

Wieder gaben wir star-Tem[®] zur Probe. Anschließend fügten wir TF in Form des ex-Tem[®] hinzu, wodurch der klassische extrinsische Gerinnungspfad aktiviert wurde.

Um diesen zu überprüfen, wird im klinischen Alltag die Thromboplastinzeit (Quick-Wert) bestimmt. Dabei wird TF als Aktivator zu einer Plasmaprobe gegeben. Die Gerinnungszeit hängt von der Konzentration der Faktoren VII, X, V, II und Fibrinogen ab. Das heißt, es sind vor allem Aussagen über die Vitamin-K-abhängigen Faktoren möglich. Die Rotations-thromboelastometrie liefert mit der extem-Messung ebenfalls Informationen über diese Faktoren. Zusätzlich sind hier jedoch auch Plättchen in der Probe enthalten. Es kann das Zusammenspiel von plasmatischer Gerinnung, die extrinsisch aktiviert ist, und Plättchen beurteilt werden. Außerdem ist ebenso wie bei der intem-Messung eine Beurteilung der Dynamik der Gerinnselfbildung möglich.

Fibtem-Messung:

Hierbei wurde der Probe erneut TF und Kalziumchlorid zugesetzt. Im Unterschied zur extem-Messung gaben wir zusätzlich Cytochalasin D als Thrombozyteninhibitor in die Küvette. Dies hemmt Aktin-Myosin-Interaktionen und damit die Thrombozyten. Durch die Hemmung der Thrombozyten ist die Gerinnselfbildung im Wesentlichen von der plasmatischen Fibrinbildung abhängig. Interessant wurde diese Messung in unserer Arbeit in erster Linie durch den Vergleich mit der extem-Messung. Beide hatten mit TF den gleichen Aktivator. Der Unterschied bestand in der Plättchenaktivität. Somit kann in der Gegenüberstellung eine Aussage über den Anteil der Plättchen bzw. der plasmatischen Gerinnung an der Gesamtgerinnung gezogen werden.

4.4. Durchflusszytometrische Messungen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen und Partikeln, die sich in Lösung befinden. Es können Aussagen zur Morphologie der Zelle und ihrer Fluoreszenz getroffen werden.

Wir verwendeten in unserem Versuch das Gerät BD FACS Calibur™ von Becton Dickinson mit einem Apple MacIntosh Computer mit CellQuest Pro Software.

Bei der Durchflusszytometrie wird die Probenflüssigkeit durch einen Unterdruck angesaugt und mit einer Trägerflüssigkeit verdünnt. Die Partikel fließen dann konstant, in unserem Versuch mit 35 $\mu\text{L}/\text{min}$, durch eine Kapillare, wobei sie einen senkrecht einfallenden luftgekühlten 488nm Argon-Ionen-Laserstrahl passieren. Der Strahl wird gestreut und an drei Fotodetektoren gemessen (Abb. 6).

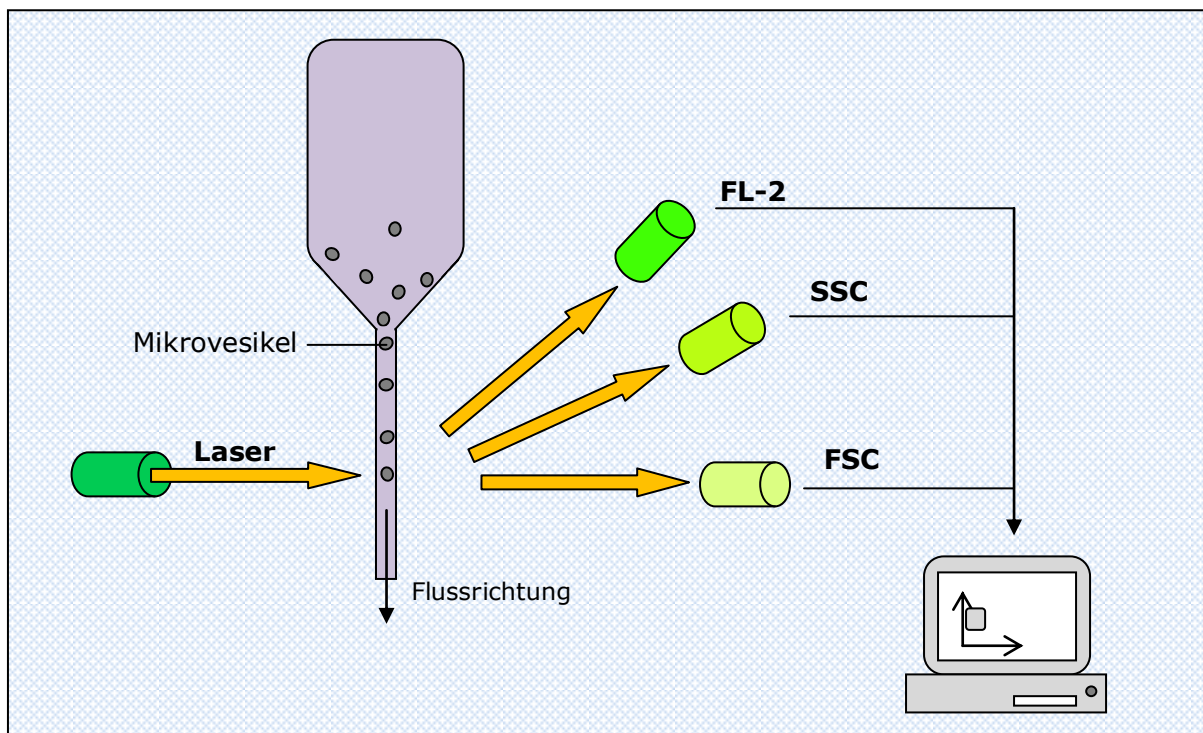
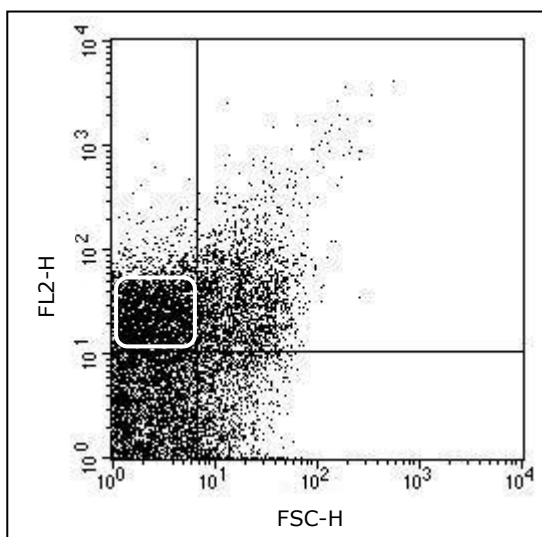


Abb. 6: Funktion FACS

- Die Vorwärtsstreuung (FSC) korreliert mit dem Volumen des Partikels. Je größer der Durchmesser des Partikels ist, umso größer wird die Absorption des Laserstrahls und umso kleiner das detektierte Signal.
- Die Seitwärtsstreuung (SSC) ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Je mehr Partikel sich in einem Aggregat befinden, umso größer ist die Seitwärtsstreuung des Lasers.
- Die dritte Größe ist das Fluoreszenzsignal. Durch den Laser werden die Fluorophore der Detektionsantikörper angeregt. Wir verwendeten mit PE markierte CD61-Antikörper, die nach Anregung Licht mit der Wellenlänge 585 nm emittierten. Dieses wurde im Fluoreszenzkanal FL-2 detektiert.

Zunächst wurde zur Feststellung der Eigenfluoreszenz der Mikrovesikel ein Leerwert ohne Antikörperzugabe vermessen. Eine Kontrolle, markiert mit Anti-Mouse-IgG1-control-PE von ImmunoTools, ergab das Ausmaß der unspezifischen Bindungen zwischen Antigen und Antikörper.

Dann wurden die Proben der TAK analysiert. Wir bestimmten die positiven Ereignisse über 20 Sekunden bzw. führten die Messung bis zu einer Ereigniszahl von 2.000.000 durch.



Die Auswertung erfolgte mit CellQuest Pro. Es wurden Dotplots erstellt, in denen durch Festlegung von Grenzwerten die Partikelanzahl bestimmt werden konnte. Dabei wurde auf der Ordinate das Fluoreszenzsignal (FL-2) und auf der Abzisse das Vorwärtstreulicht abgetragen.

Abb. 7: Dotplot zur Bestimmung der Anzahl der Mikrovesikel (Ereignisse im linken oberen Quadranten)

Die in den Kontrollen gewonnenen Werte über die Eigenfluoreszenz der Mikrovesikel und die unspezifischen Bindungen wurden zur Anpassung des FL-2 verwendet. Durch Einstellung des Vorwärtsstreulichtes und dadurch Abgrenzung aller Teilchen ab einer bestimmten Größe wurden verbliebene Thrombozyten herausgefiltert. Analysiert wurde dadurch die Ereignismenge im linken oberen Quadranten, die den Mikrovesikeln entsprach (Abb. 7).

4.5. Bestimmung der Thrombinbildung

Unsere Proben wurden auf ihre Fähigkeit Thrombin zu bilden untersucht. Dazu verwendeten wir den TECHNOTHROMBIN[®] TGA. Die Untersuchung wurde mit dem FLUOstar Optima der BMG LABTECH durchgeführt.

Bei dem TGA findet eine Aktivierung der Gerinnungskaskade durch TF, negativ geladene Phospholipide und Kalziumchlorid statt. Dabei entsteht Thrombin. Das Thrombin ist enzymatisch aktiv und spaltet das Substrat Z-G-G-R-AMC. Dadurch fängt der Fluorophor AMC an zu fluoreszieren. Die Anregungswellenlänge des Lasers beträgt 355nm, das Fluoreszenzsignal wird mittels eines Sensors bei einer Wellenlänge von 460 gemessen (Abb. 8).

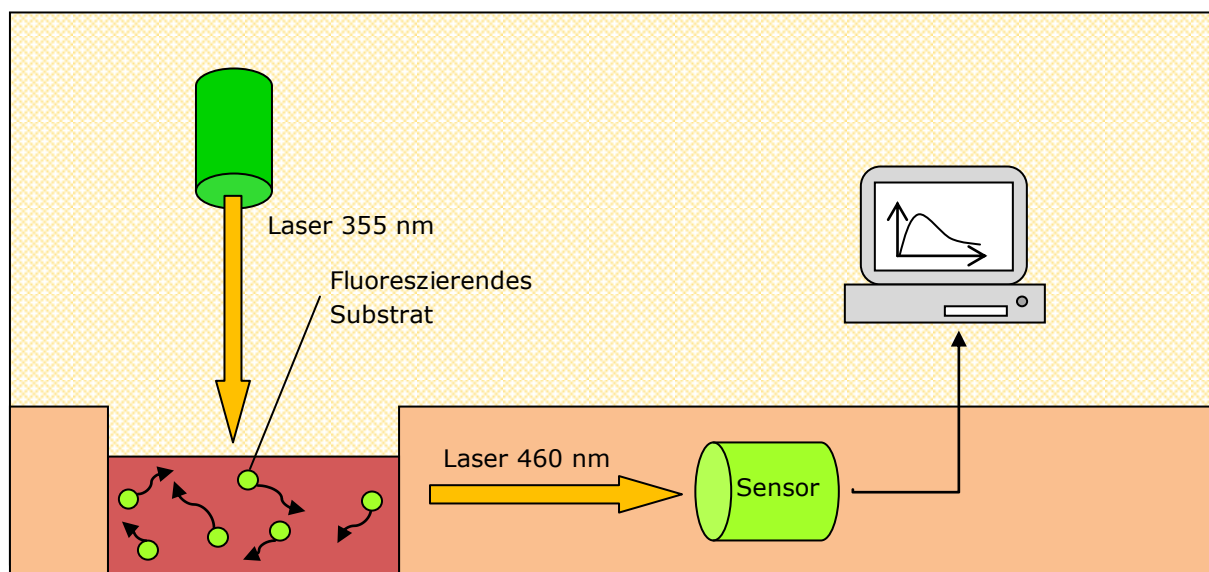


Abb. 8: Messprinzip TGA

In unserem Versuch wurde das Fluoreszenzsignal an verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, um die Kinetik der Thrombinbildung zu evaluieren. Aus dem Fluoreszenzsignal kann die Menge von Thrombin in nM und somit die Bildungs- und Abbaurate von Thrombin berechnet werden. Damit spiegelt es die Gerinnungsfähigkeit eines Blutproduktes während des gesamten Verlaufs der Gerinnung wider. Das Ergebnis kann graphisch in der Thrombinkurve dargestellt werden. Dabei ist die Thrombin-konzentration gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 9).

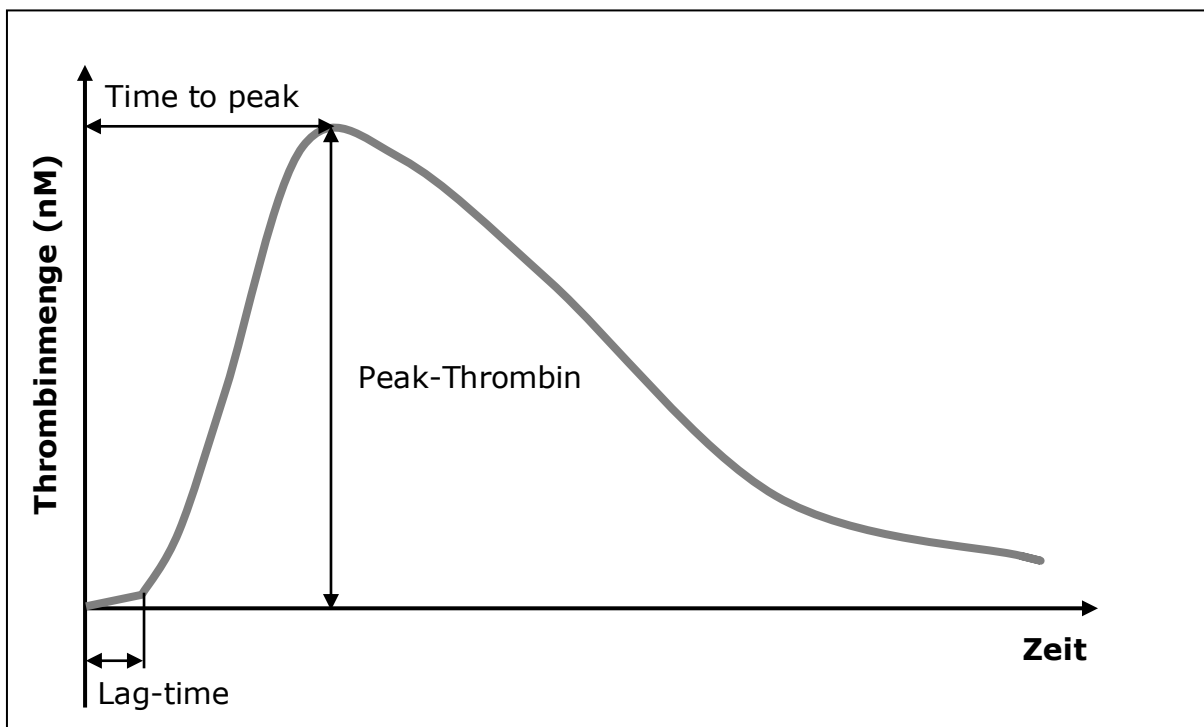


Abb. 9: Thrombinkurve

Es gibt fünf wichtige Kenngrößen:

- Die Latenzphase (lag-time) gibt die Zeit von der Zugabe des Reagenz bis zur ersten Thrombinbildung an. Sie ist abhängig von der Menge des zugegebenen TF.
- Die Steigung gibt die höchste Rate der Thrombinbildung an und wird mit dem Velocity Index berechnet.

$$\text{Velocity Index (nM/s)} = \text{peak-thrombin} \div (\text{peak-time} - \text{lag-time})$$

- Die maximale Thrombinbildung wird durch das peak-thrombin angegeben.
- Die Zeit bis zur maximalen Thrombinbildung wird als peak time bezeichnet.
- Die Fläche unter der Kurve (AUC) gibt die Gesamtmenge an gebildetem Thrombin wieder.

Alle verwendeten Materialien entstammten dem TECHNOTHROMBIN® TGA-Kit der Technoclone GmbH. Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt.

Zunächst wurde die Kalibrationskurve erstellt. Diese ist für die Umrechnung der Fluoreszenzintensität in die Thrombinkonzentration notwendig. Der TGA-Thrombin-Kalibrator, der TGA-Puffer und das TGA-Substrat wurden in den vorgegebenen Mengen destillierten Wassers gelöst. Der Thrombinkalibrator enthält 1000 nM Thrombin in Pufferlösung. Nach 20 min Rekonstitutionszeit wurden die Reagenzien gemischt. Anschließend stellten wir die von Technoclone vorgegebenen Standardverdünnungen her. Von den vier Standardverdünnungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 40 µl in eine Microlon-96W-Flatbottom-High-binding-Mikrotiterplatte von Greiner pipettiert. Das Zugabe des Substrates erfolgte durch eine im BMG LABTECH FLUOstar Optima integrierte automatische Pipette. Hierfür wurde das Substrat in ein Zentrifugenröhrchen (13 ml) von Sarstedt gegeben und im Gerät installiert. Die automatische Pipette wurde gespült, mit Substrat gefüllt und auf ein Pipettiervolumen von 50 µl eingestellt. Die Mikrotiterplatte wurde in das BMG Labtech FLUOstar Optima eingelegt und der Messvorgang gestartet.

Danach erfolgte die Messung der Proben. Dazu wurde das zweite Kryoröhrchen aufgetaut. Außerdem wurden das TGA-Substrat, das TGA-Reagenz und die Kontrollen in vorgegebenen Mengen destillierten Wassers gelöst. Das TGA-Reagenz enthält hoch konzentrierte Phospholipidmicellen

mit rekombinantem humanen TF in Pufferlösung. Die Kontrollen bestehen aus humanem Plasma mit unterschiedlicher Thrombingenerierungsfähigkeit. Die Reagenzien wurden nach 20 min sorgfältig gemischt.

Zur Durchführung des TGA stellten wir zunächst ein Reagenz-Substrat-Gemisch aus Reagenz und Substrat Z-G-G-R-AMC im Verhältnis 1:5 her und pipettierten jeweils 60 µl in die Mikrotiterplatte. Dazu wurden 40 µl der zu untersuchenden Plasmaprobe bzw. die Kontrollen gegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in den Fluoreszenzleser eingelegt und die Messung gestartet.

Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Messzeitpunkte wurde in eine excel-Tabelle exportiert und mit der Software des BMG FLUOStar Optima analysiert.

4.6. Statistik

Für alle Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$ angenommen.

Ein Doppelkonzentrat wurde jeweils wie ein Einzelkonzentrat behandelt und doppelt vermessen. Hiervon wurden die Mittelwerte gebildet und in die Auswertung aufgenommen, sodass 47 Datensätze resultieren.

Thrombozytenkonzentration:

Es wurden die Mittelwerte der Thrombozytenkonzentrationen von den Tagen null, vier und sieben gebildet und mit der Varianzanalyse ausgewertet. Zudem wurde geprüft, ob der TAK-Typ (Einzel- oder Doppelkonzentrat) einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration hat.

Ergebnisse der Rotationsthrombelastometrie:

Die Messdaten wurden in einer Excel-Tabelle festgehalten und anschließend in SPSS überführt.

Die Faktoren, die einen Einfluss auf die ROTEM-Parameter haben können, wurden in Gruppen kodiert.

Für jeden Parameter (CT, CFT, MCF und alpha) und jede Meßreihe (intem, extem, fibtem) wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Zur Beurteilung signifikanter Veränderungen wurde die Pillai-Spur verwendet. Wenn signifikante Unterschiede auftraten, wurde zum Feststellen des genauen Zeitpunktes, das heißt, zwischen welchen Tagen diese stattfanden, der t-Test für abhängige Stichproben durchgeführt.

Ergebnisse der Durchflusszytometrie:

Die Messdaten wurden in SPSS festgehalten. Die Mittelwerte der Anzahl der Mikrovesikel wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben verglichen. Anschließend erfolgte eine alpha-Adjustierung nach Holm und Schaffer.

Thrombinmessung:

Die Daten wurden in excel überführt. Für jeden Tag bestimmten wir die Mittelwerte für lag-time, peak-thrombin, peak-time, velocity und AUC. Diese wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1. Entwicklung der Thrombozytenkonzentration

Aus den mit dem Blutbildautomaten gemessenen Thrombozytenkonzentrationen wurden die Mittelwerte ermittelt (Abb. 10) und mit Hilfe der Varianzanalyse mit Messwiederholung auf signifikante Unterschiede untersucht.

Die Unterschiede in der Thrombozytenkonzentration während der Lagerung waren nicht signifikant. Die Schwankungen mit scheinbarer Zunahme der Thrombozytenzahl zum vierten Tag können auf zufällige Fehler zurückzuführen sein.

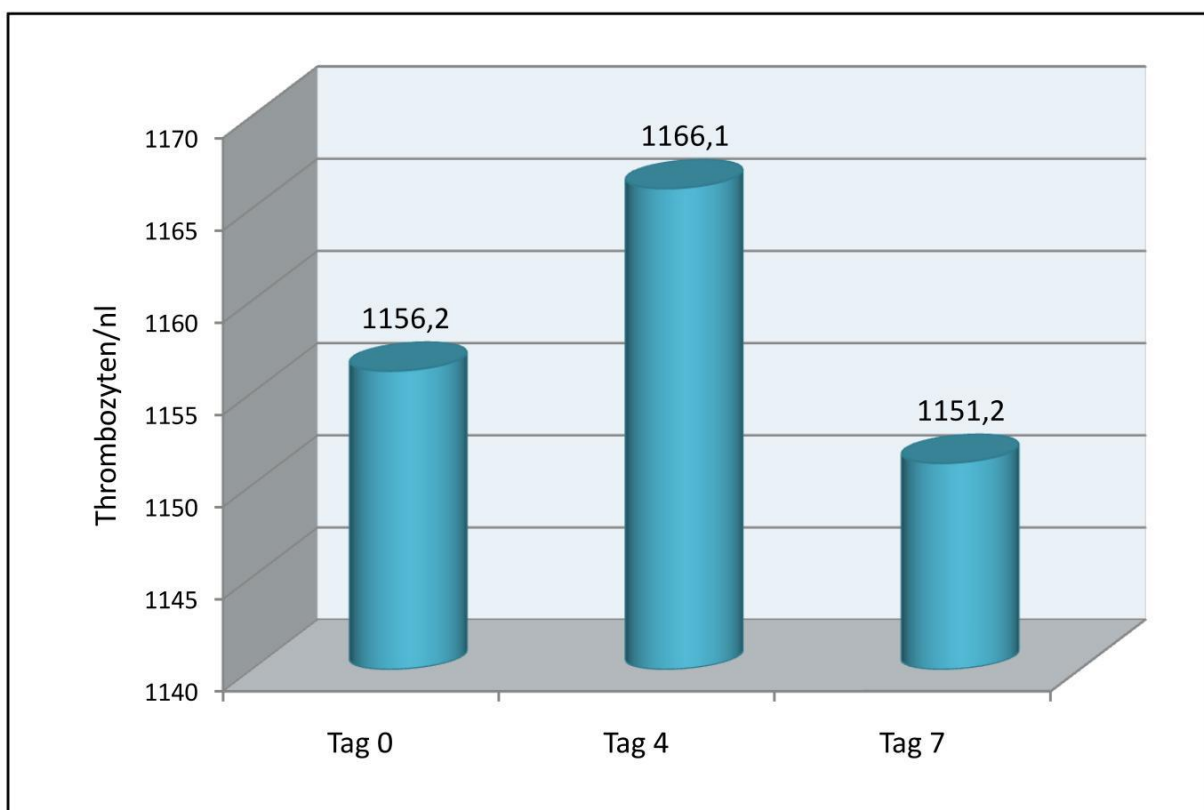


Abb. 10: Mittelwerte der Thrombozytenkonzentration

Die TAK waren in 21 Fällen Einzel- und in 26 Fällen Doppelkonzentrate. Auffallend waren die bei den Doppelkonzentraten höheren Thrombozytenkonzentrationen. Mit Hilfe des t-Testes für abhängige Stichproben wurden die Mittelwerte der Einzel- bzw. Doppelkonzentrate ausgewertet (Abb. 11). Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der Thrombozytenkonzentrationen festgestellt.

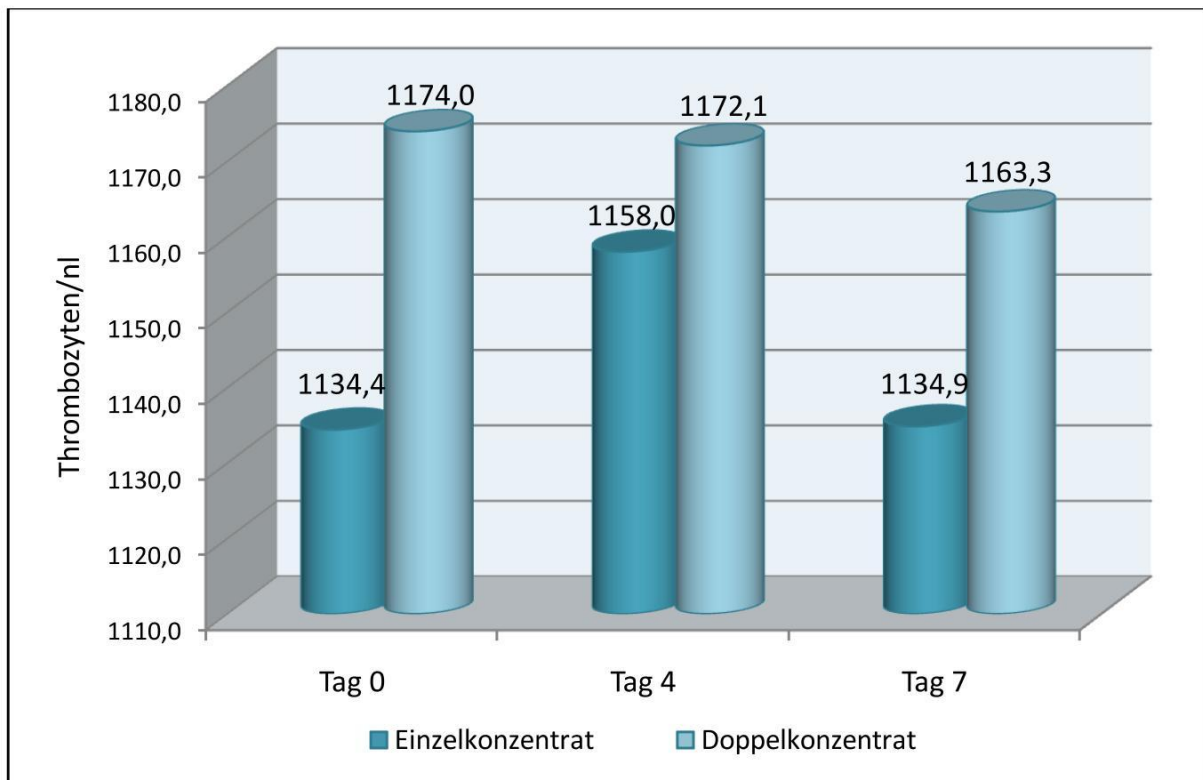


Abb. 11 Mittelwerte der Thrombozytenkonzentration von Einzel- und Doppelkonzentraten

5.2. Ergebnisse der rotationsthrombelastometrischen Messungen

5.2.1. Intem-Messung

Der erste durchgeführte Test war die intem-Messung. Hierbei wurde vor allem der intrinsische Anteil der Gerinnung untersucht. Die Aktivierung erfolgte durch negativ geladene Oberflächen und partielles Thromboplastin. Dabei wurden besonders die Faktoren XII, XI, IX und VIII erfasst, die zur Aktivierung von Faktor X führen.

Alle Parameter verhielten sich entsprechend einer Abnahme der Gerinnungsleistung. In Abbildung 12 sind sie im Überblick dargestellt. Signifikante Veränderungen, die in der Pillai-Spur für CT und MCF gefunden und mit dem gepaarten t-Test weiteruntersucht wurden, sind farbig gekennzeichnet. Sowohl die Mittelwerte mit den Standardabweichungen als auch die Ergebnisse des t-Tests sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Parameter	Tag	Mittelwert	Standardabweichung	Vergleich Tag	Signifikanz
CT	0	184,85	61,17	0-4	0,901
CT	4	186,11	48,49	4-7	0,006
CT	7	227,28	89,54	0-7	0,001
CFT	0	36,13	22,46	-	-
CFT	4	39,57	28,16	-	-
CFT	7	47,62	46,08	-	-
MCF	0	80,96	5,18	0-4	0,874
MCF	4	81,06	4,83	4-7	0,000
MCF	7	77,77	8,47	0-7	0,000
alpha	0	80,96	3,85	-	-
alpha	4	80,32	4,98	-	-
alpha	7	80,07	4,64	-	-

Tab. 1: Mittelwerte von CT, CFT, MCF und alpha der intem-Messung und signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf

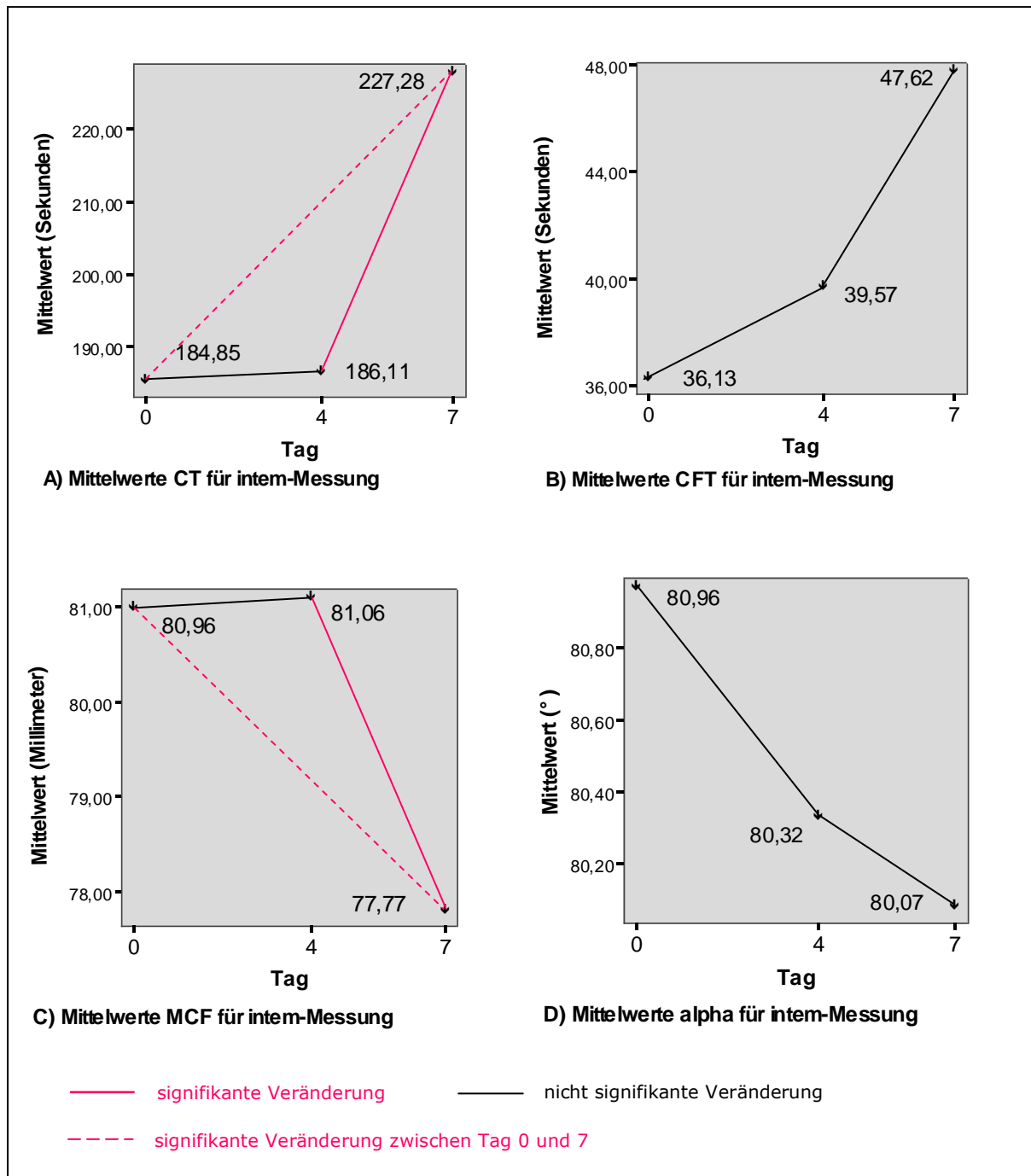


Abb. 12: Mittelwerte von CT (A), CFT (B), MCF (C) und alpha (D) der intern-Messung in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten Tag null, vier und sieben

In der intern-Messung nahm die Zeit bis zum Beginn der Gerinnung und bis zum Erreichen einer Gerinnselfestigkeit von 20 mm (CT und CFT) zu. Signifikant war die Verlängerung bei der CT zum siebten Tag ($p=0,006$ bzw. $0,001$). Die MCF blieb bis zum vierten Tag nahezu konstant und fiel

dann signifikant ($p=0,000$) ab. Der alpha-Winkel wurde zum vierten Tag kleiner. Allerdings waren diese Veränderungen nur gering und nicht signifikant.

Bis zum vierten Tag war die Gerinnungsaktivität in der intern-Messung gut erhalten. Es gab keine signifikanten Veränderungen. Zum siebten Tag hingegen veränderten sich CT und MCF signifikant im Sinne einer abnehmenden Gerinnungsleistung.

5.2.2. Extem-Messung

In der extem-Messung wurde der extrinsische Anteil der Gerinnung untersucht. Die Aktivierung erfolgte mit TF.

Einen Überblick über die Entwicklung der Mittelwerte der Parameter in der extem-Messung gibt Abbildung 13. In der mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung fanden sich signifikante Veränderungen für alle vier Parameter. Deshalb wurde der t-Test durchgeführt. Mittelwerte und signifikante Veränderungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Parameter	Tag	Mittelwert	Standard-abweichung	Vergleich Tag	Signifikanz
CT	0	50,64	17,35	0-4	0,405
CT	4	48,66	8,54	4-7	0,000
CT	7	57,04	15,69	0-7	0,079
CFT	0	35,26	12,32	0-4	0,001
CFT	4	29,30	5,43	4-7	0,756
CFT	7	29,51	4,66	0-7	0,002
MCF	0	80,81	3,27	0-4	0,883
MCF	4	80,91	5,53	4-7	0,009
MCF	7	78,77	6,47	0-7	0,002
alpha	0	79,57	4,56	0-4	0,220
alpha	4	79,96	5,27	4-7	0,001
alpha	7	78,70	6,12	0-7	0,031

Tab. 2: Mittelwerte von CT, CFT, MCF und alpha der extem-Messung und signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf

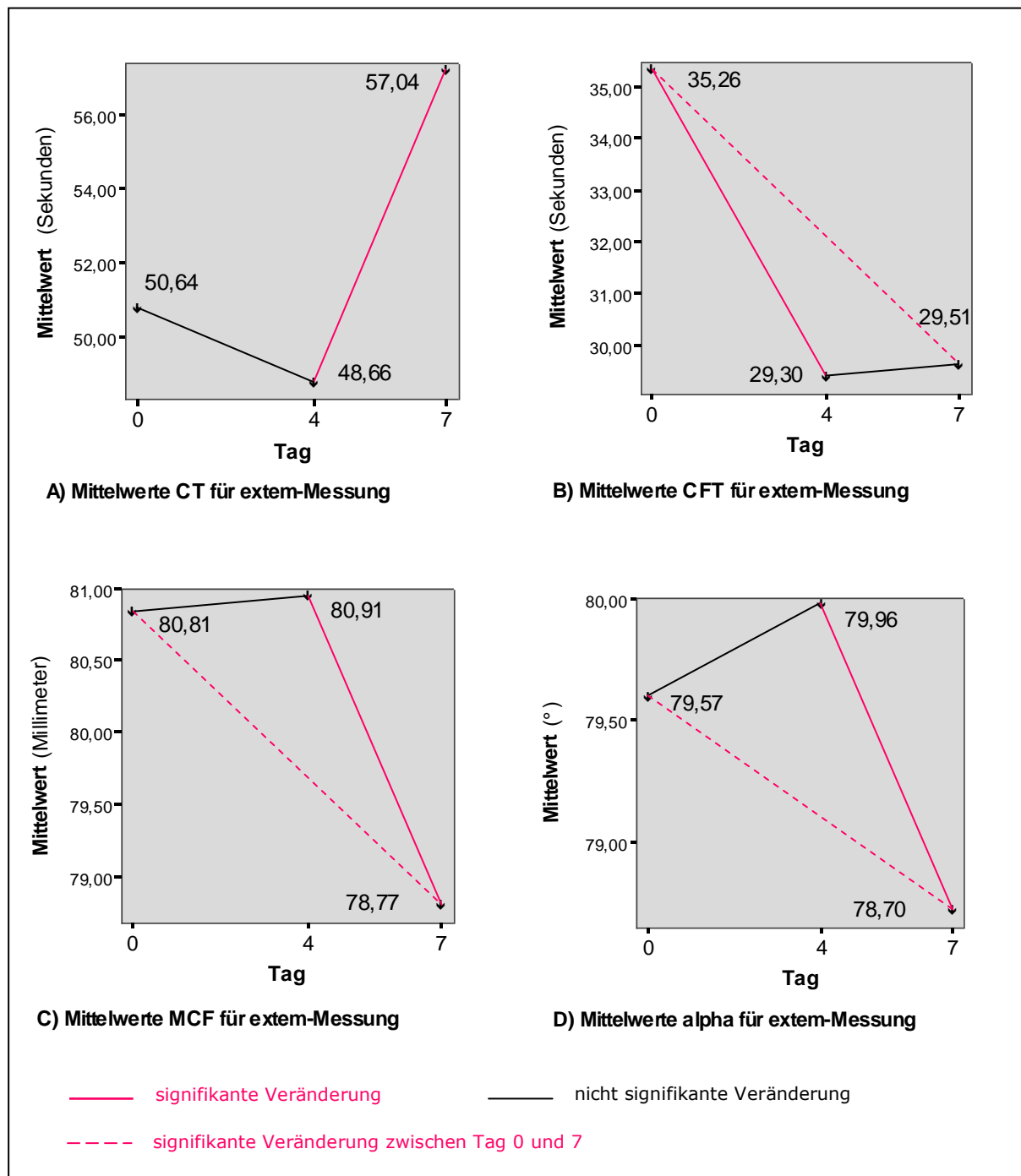


Abb. 13: Mittelwerte von CT (A), CFT (B), MCF (C) und alpha (D) der extem-Messung in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten Tag null, vier und sieben

Die CT nahm zwischen dem vierten und siebten Tag signifikant zu. Das heißt, die Initiierung der Gerinnung fand signifikant später statt. Im Gegensatz dazu nahm die CFT zwischen Tag null und vier signifikant ab, zum siebten Tag fand keine weitere signifikante Abnahme statt.

Die maximale Gerinnselfestigkeit und der alpha-Winkel zeigten zum vierten Tag geringe Veränderungen und nahmen zum siebten Tag signifikant ab. Die Abnahme deutet auf eine reduzierte Gerinnungsfähigkeit hin.

5.2.3. Fibtem-Messung

Bei der fibtem-Messung waren die Thrombozyten durch Cytochalasin D gehemmt. Dadurch war es möglich, den Beitrag des Blutplasmas an der Gesamtgerinnung und damit auch den Thrombozytenbeitrag zu bestimmen.

Einen Überblick über die Entwicklung von CT, CFT, MCF und alpha gibt Abbildung 14. In der mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung fanden sich signifikante Veränderungen für CFT, MCF und alpha in der Pillai-Spur. Es erfolgte die Analyse mit dem gepaarten t-Test. Signifikante Veränderungen sind in Abbildung 14 markiert und in Tabelle 3 zusammengefasst.

Parameter	Tag	Mittelwert	Standard-abweichung	Vergleich Tag	Signifikanz
CT	0	57,00	13,65	0-4	-
CT	4	51,51	20,37	4-7	-
CT	7	53,60	12,97	0-7	-
CFT	0	65,09	78,11	0-4	0,676
CFT	4	68,33	49,15	4-7	0,132
CFT	7	99,91	170,60	0-7	0,016
MCF	0	70,13	10,72	0-4	0,031
MCF	4	68,57	13,31	4-7	0,064
MCF	7	66,91	16,16	0-7	0,004
alpha	0	53,60	25,93	0-4	0,268
alpha	4	52,32	27,04	4-7	0,117
alpha	7	50,96	26,80	0-7	0,004

Tab. 3: Mittelwerte von CT, CFT, MCF und alpha der fibtem-Messung und signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf

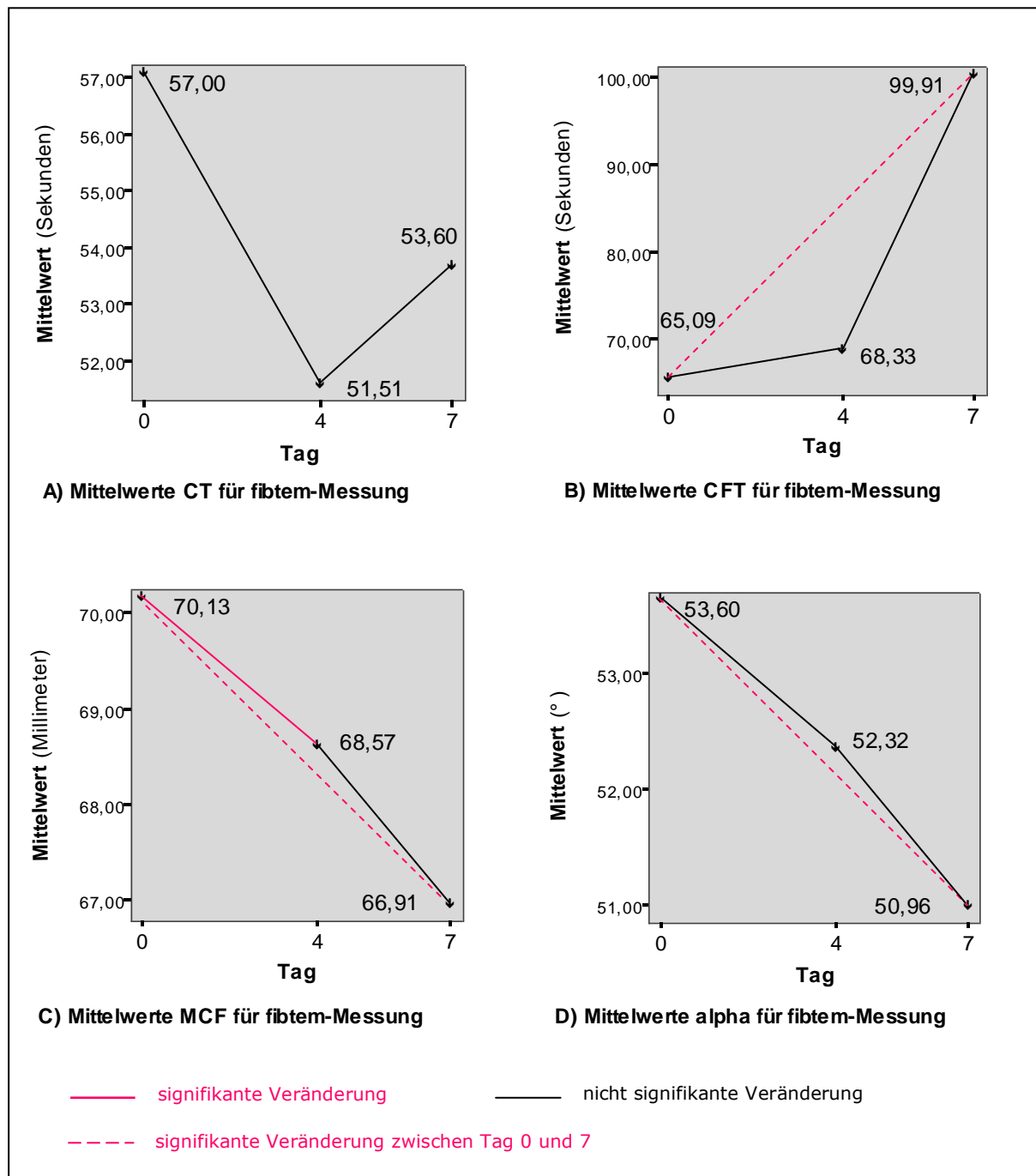


Abb. 14: Mittelwerte von CT (A), CFT (B), MCF (C) und alpha (D) der fibtem-Messung in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten Tag null, vier und sieben

Die CT nahm zunächst ab, dann zu. Beide Veränderungen waren nicht signifikant. Dagegen stieg die CFT an. Dieser Anstieg war im Vergleich von Tag null und Tag sieben signifikant. Die MCF fiel kontinuierlich. Signifikant war der Abfall von Tag null zu Tag vier und zwischen Tag null und sieben.

Der alpha-Winkel nahm am stärksten zum vierten Tag ab, allerdings war ein signifikanter Unterschied erst im Vergleich von Tag null und sieben zu finden.

Die Parameter verhielten sich im Sinne einer Abnahme der Gerinnungsleistung. Die CFT und der alpha-Winkel zeigten nur im Vergleich des gesamten Zeitraums von Tag null und sieben signifikante Veränderungen. Das heißt, dass hier evaluierte Veränderungen der Gerinnung bis zum vierten Tag noch gut erhalten waren. Erst bei einer Verlängerung der Lagerungsdauer auf sieben Tage nahm die Gerinnungsleistung ab.

5.2.4. Auswirkungen verschiedener Einflussfaktoren

Einfluss des Alters

Die Altersspanne der Spender reichte von 26 bis 66 Jahren. Da diese Spanne groß war, haben wir zwei Gruppen gebildet, um einen möglichen Einfluss des Alters auf die Gerinnungsaktivität der TAK zu evaluieren. Kriterium für die Trennung war der Median, der bei 40 Jahren lag. Es ergaben sich zwei Gruppen, aus den 0-40-Jährigen (n=25) und den über 40-Jährigen (n=22).

Ob das Merkmal Alter einen Einfluss auf die Parameter CT, CFT, MCF und den alpha-Winkel hatte, wurde mittels einer Varianzanalyse mit Messwiederholung untersucht. Zur Auswertung wurde dabei die Pillai-Spur betrachtet. Im Vergleich der Gruppen der über bzw. unter 40-Jährigen fand sich in der fibtem-Messung bei der MCF ein signifikanter Einfluss des Alters. Hier waren die Mittelwerte der über 40-Jährigen größer ($p=0,046$).

Einfluss Geschlecht

Die Verteilung von männlichen zu weiblichen Spendern war ungleichmäßig. Von den 47 TAK waren sieben Spender weiblich und vierzig Spender männlich. Im Vergleich von weiblichen und männlichen Spendern ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Einfluss der Blutgruppe

Die TAK-Spender besaßen hauptsächlich die Blutgruppe 0 (n=26) und A1 (n=16). Es fand sich kein signifikanter Einfluss des Faktors Blutgruppe auf die ROTEM-Parameter.

Einfluss Rhesusfaktor

Von den TAK-Spendern waren sechs Rhesus-negativ und 41 Personen Rhesus-positiv. Auch hier wurde der Einfluss auf die Parameter der Rotationsthrombelastometrie während der Lagerung untersucht.

Rhesus-positive Spender hatten in der fibtem-Messung niedrigere CFT-Werte und größere alpha-Winkel. Beides sind Hinweise auf eine höhere Gerinnungsaktivität.

Einfluss von Einzel- bzw. Doppelkonzentraten

Die TAK waren in 21 Fällen Einzel- und in 26 Fällen Doppelkonzentrate. Auch wenn sich die Mittelwerte der TAK nicht signifikant unterschieden, haben wir einen eventuellen Einfluss des Konzentrattyps mit der Varianzanalyse mit Messwiederholung getestet.

Der Konzentrattyp hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte der Rotationsthrombelastometrie.

Einfluss Thrombozytenkonzentration am Tag null

Die 47 TAK wurden in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe eins enthielt alle Konzentrate bis zu einer Thrombozytenkonzentration von einschließlich 1100 Thrombozyten/nl, Gruppe zwei die Konzentrate mit einer Thrombozytenkonzentration zwischen 1101 Thrombozyten/nl und 1232 Thrombozyten/nl und Gruppe drei alle TAK mit einer Konzentration größer oder gleich 1233 Thrombozyten/nl.

Die ansteigende Thrombozytenkonzentration im Ausgangskonzentrat der TAK hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ROTEM-Messwerte.

5.3. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen

Mikrovesikel sind ein Zeichen für die Aktivierung von Plättchen. Hierzu wurden die Mikrovesikel mit dem Plättchenantikörper CD-61-PE markiert und ihre Anzahl mit dem Durchflusszytometer evaluiert. Aus der Anzahl der Mikrovesikel wurden für jeden Messzeitpunkt die Mittelwerte gebildet. Diese stiegen mit der Lagerungsdauer an. Der Ausgangswert betrug 859, stieg am vierten Tag auf 1556 und am siebten Tag auf 1981. Es wurde der t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt, wobei sich zwischen allen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede zeigten. Eine Synopse der Messergebnisse und signifikanten Veränderungen ist in Abbildung 15 dargestellt.

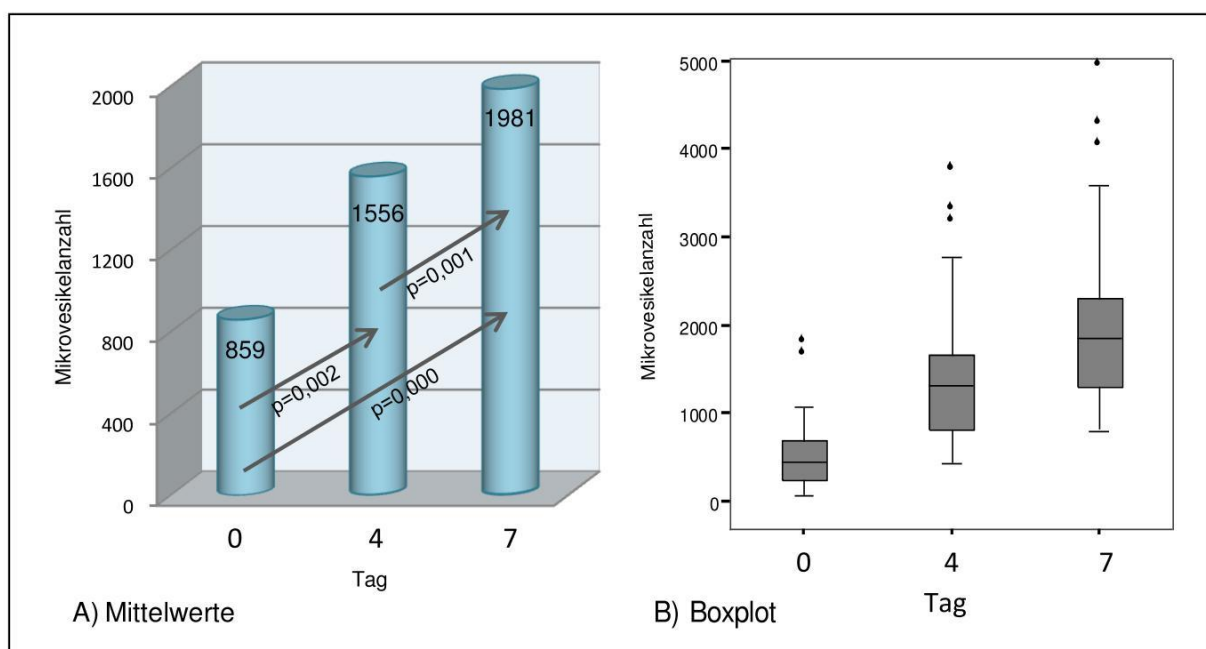


Abb. 15: Mittelwerte (A) und Boxplot (B) der Anzahl der Mikrovesikel an den Tagen null, vier und sieben (Darstellung ohne Extremwerte)

Die Gesamtalternativhypothese, die besagt, dass die Anzahl der Mikrovesikel konstant ansteigt, wurde durch eine alpha-Adjustierung nach Holm und Schaffer überprüft. Der Vergleich der p-Werte ergab auch hier Signifikanz.

5.4. Ergebnisse des Thrombin Generation Assay

Der TGA ist eine Möglichkeit die Thrombinbildung zu evaluieren. Wir untersuchten Plasmaproben der TAK von den Tagen null, vier und sieben. Die ermittelten Parameter waren die lag-time, das peak-thrombin, die Zeit bis zum Peak, die Geschwindigkeit und die Fläche unter der Kurve.

Die lag-time nahm im Verlauf der Lagerung ab. Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant.

Das peak-thrombin änderte sich nur geringfügig und diese Veränderungen unterlagen keiner Signifikanz.

Die Zeit bis zum Peak blieb über die Lagerungsdauer nahezu konstant und veränderte sich nicht signifikant.

Die Geschwindigkeit blieb bis zum vierten Tag nahezu konstant und nahm zum siebten Tag zu. Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant.

Die Gesamtmenge an produziertem Thrombin (Fläche unter der Kurve) blieb ebenfalls bis zum vierten Tag konstant und stieg dann an, allerdings nicht signifikant.

Die Bestimmung der Thrombinbildungskapazität von Plasma, das aus unterschiedlich lang gelagerten TAK gewonnen wurde, hat keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Thrombinbildungsgeschwindigkeit und Thrombinmenge aufgezeigt.

6 Diskussion

TAK werden zur prophylaktischen Transfusion vor dem Auftreten klinischer Symptome bei Thrombozytopenien und zur Therapie bei traumatisch oder chirurgisch bedingten Blutungen eingesetzt. Ein großer Bedarf an Transfusionen und hohe Kosten für die Produktion und Lagerung der TAK machen eine möglichst lange Lagerungszeit wünschenswert. Die Qualität der TAK muss jedoch erhalten bleiben, damit Patienten unabhängig von der Lagerungsdauer der Konzentrate effektiv behandelt werden.

Bisher war die bakterielle Kontamination ein wesentlicher limitierender Faktor für eine längere Lagerungszeit. Deshalb werden von 1% der TAK zur Qualitätssicherung Blutkulturen angelegt. Sie stellen einen sehr sensitiven Test dar. Allerdings steht das Ergebnis dieser Untersuchung oft erst nach der Transfusion der TAK fest, sodass lediglich das Zurückverfolgen und eine Verbesserung der Produktion möglich sind. Es gibt andere Tests wie die PCR, die wesentlich schneller durchgeführt werden können. Eine zukunftsweisende Entwicklung ist zudem die Möglichkeit der Pathogeninaktivierung (Blajchmann et al. 2005, Seghatchian und de Sousa 2006). Hierbei werden photochemische Methoden mit einer Bindung von Psolaren bzw. Riboflavin an pathogene DNS und anschließende Bestrahlung mit UV-Licht angewandt. Dadurch könnte das Problem der bakteriellen Kontamination in den Hintergrund treten. Allerdings verursachen diese Verfahren eine Aktivierung von Plättchen.

Im Mittelpunkt steht die Frage, wie sich die Fähigkeit der TAK zur Verbesserung der Gerinnungssituation eines Patienten während der Lagerung verändert. Um dies zu evaluieren, wurden *in-vitro*-Studien an TAK und *in-vivo*-Studien an gesunden Probanden und an erkrankten Personen durchgeführt. Bei unserer Arbeit handelt es sich um *in-vitro*-Versuche, welche die Eigenschaften der TAK während der Lagerung näher beschreiben sollen.

6.1. Entwicklung der Thrombozytenkonzentration

Die Thrombozyten sind für die Hämostase essentiell. Sie bilden einen festen Plättchenpfropf, der das Gefäß bei einer Verletzung abdichtet. Außerdem sezernieren und aktivieren sie Gerinnungsfaktoren. Ihre Oberfläche bietet den Gerinnungsfaktoren Schutz vor Inaktivierung und ermöglicht die Bindung an weitere Plättchen.

Deshalb würde eine abnehmende Thrombozytenzahl in den TAK in jedem Fall eine verminderte Fähigkeit zur Verbesserung der Gerinnung beim Transfundierten bedeuten. In Übereinstimmung mit Tynngård und Rock (Tynngård et al. 2008, Rock et al. 2006) konnten wir eine konstante Plättchenkonzentration über die Lagerungsdauer von sieben Tagen feststellen.

Die Doppelkonzentrate enthielten mehr Plättchen. Dies kann auf Eigenschaften des Spenders zurückgeführt werden, der eine höhere Thrombozytenkonzentration aufweisen muss, um zur Doppelkonzentrat-spende zugelassen zu werden. Allerdings war der Unterschied der Mittelwerte der Thrombozytenkonzentration zu den Einzelkonzentraten nicht signifikant. Damit sind die Proben vergleichbar und auch in der klinischen Anwendung gleichwertig.

Eine konstante Plättchenkonzentration über die Lagerungsdauer der TAK ist eine wesentliche Voraussetzung für eine effektive Verbesserung der Gerinnung beim Empfänger des Konzentrates. Allerdings gibt es Untersuchungen der Thrombozytenmorphologie, die eine Beeinträchtigung durch Lagerung selbst bei gleichbleibender Konzentration wahrscheinlich macht. Das betrifft die Verlagerung der Zellorganellen nach zentral und die Ausbildung von Pseudopodien (Rinder und Ault 1998). Beide Vorgänge sind über eine ansteigende Kalziumkonzentration und anschließende Veränderungen im Zytoskelett des Thrombozyten ausgelöst und werden weiter unten ausführlich diskutiert.

6.2. Veränderung globaler Gerinnungsparameter

Die Rotationsthrombelastometrie findet ihre Anwendung in der Beurteilung der Gerinnungssituation eines Patienten. Sie ist ein *in-vitro*-Globaltest der Hämostase und spiegelt den Ablauf der Gerinnung und den Einfluss der Plättchen sowie die Fibrinolyse wider. Das heißt, alle Vorgänge, die während der Gerinnung stattfinden, werden abgebildet und nicht nur isolierte Teile.

Aus diesem Grund sind die Einsatzbereiche vielfältig. Schwerpunkte sind die Diagnostik im chirurgischen Bereich sowie in der Überwachung von Gerinnungsstörungen. Die Rotationsthrombelastometrie führte in der kardiovaskulären Chirurgie zur Reduktion von Reexplorationen (Spiess et al. 1995), Transfusionen und Kosten (Spalding et al. 2007). Mit Hilfe dieser Methode kann die Gerinnungssituation während kardiochirurgischer Eingriffe und postoperativ überwacht und eine adäquate Therapie eingeleitet werden (Reinhöfer et al. 2008). Zur Vorhersage von intra- und postoperativen Blutungen ist die Datenlage inkonsistent, allerdings machen normale ROTEM-Messwerte eine chirurgische Ursache einer Blutung wahrscheinlich (Cammerer et al. 2003). In der Leberchirurgie wird die Rotationsthrombelastometrie zur Überwachung der Hämostase und als Indikator für notwendige Transfusionen eingesetzt (Cerutti et al. 2004). Auch in der Gerinnungsdiagnostik bei Schwangeren und post partum findet die Rotationsthrombelastometrie Anwendung (Gottumukkala et al. 1999). Gerinnungsstörungen wie eine Hyperfibrinolyse, ein Mangel an Gerinnungsfaktoren, eine Thrombozytopenie oder eine schwere Thrombozytopathie können mit der Rotationsthrombelastometrie diagnostiziert werden (Görlinger et al. 2008). Zudem kann eine antikoagulatorische und prokoagulatorische Therapie überwacht werden (Sorensen und Ingerslev 2005).

Für die Bestimmung von Gerinnungsparametern mit der Rotations-thrombelastometrie von gelagerten TAK existieren keine Normbereiche, da die Methode ursprünglich für Vollblutproben entwickelt wurde. Dennoch können aus Veränderungen der Parameter während der Lagerung Rückschlüsse auf Veränderungen im TAK gezogen werden.

Wir führten die Rotationsthrombelastometrie mit drei Schwerpunkten durch.

Die intem-Messung, die über die Aktivierung durch negativ geladene Oberflächen vor allem die klassischen intrinsischen Faktoren beurteilt, ergab eine abnehmende Gerinnungsfähigkeit über die Lagerungsdauer. Das zeigte sich an einer verlängerten CT sowie einer Abnahme der MCF. Beide Veränderungen waren am siebten Tag signifikant. Das heißt umgekehrt, dass die Fähigkeit der TAK auf den intrinsischen Gerinnungsaktivator hin zu koagulieren bis zum vierten Tag erhalten blieb. Die klassisch intrinsische Gerinnungsaktivierung über Faktor XII und die Kofaktoren Präkallikrein und HMWK findet in künstlichen Umgebungen mit negativ geladener Oberfläche statt. Deshalb haben Patienten mit einer Insuffizienz dieser Faktoren zwar eine verlängerte aPTT, aber keine Blutungsneigung (Gailani und Renné 2007). Nichtsdestotrotz spielen die Faktoren eine Rolle in der Thrombenbildung. Sie stabilisieren ein Gerinnsel (Renné et al. 2005). Die nachfolgenden Faktoren XI, IX und VIII sind in jedem Fall wichtige Agonisten in der Thrombinbildung und essentiell für eine funktionierende Gerinnung. Sie sind jedoch in der intem-, extem- und fibtem-Messung in gleicher Weise vorhanden und können deshalb nicht die Ursache für Unterschiede zwischen den Messungen sein. TF als wichtiger Aktivator fehlt in der intem-Messung. Dies ist mit der Situation *in vivo* nicht vergleichbar und damit hat dieser Test, was die Aktivierung der Gerinnung angeht, eine untergeordnete Bedeutung. Er zeigte allerdings durch die zunehmende CT und abnehmende MCF, dass während der Lagerung Veränderungen stattfanden, die für eine Beeinträchtigung der Gerinnungsfähigkeit der TAK sprechen.

Die *in vivo* bedeutsame Aktivierung findet über TF statt. Die Fähigkeit der Konzentrate auf diesen „natürlichen“ Reiz hin ein Gerinnsel zu formieren wurde in der extem-Messung mit TF als Aktivator untersucht. Die Abnahme der MCF zeigte eine geringere Gerinnselfestigkeit des über sieben Tage gelagerten TAK. Der alpha-Winkel wurde kleiner, was für eine niedrigere Geschwindigkeit der Gerinnselbildung spricht. Dazu passt die Zunahme der CT zwischen Tag vier und sieben. Ungewöhnlich war die Abnahme der CFT vor allem zwischen Tag null und vier. Auch CT, MCF und alpha-Winkel zeigten zum vierten Tag Entwicklungen, die auf eine größere Gerinnungsaktivität hindeuten. Allerdings waren sie nicht signifikant. Über den gesamten Messzeitraum überwogen Veränderungen, die für eine Abnahme der Gerinnungsleistung sprechen und zum siebten Tag signifikant waren.

Es zeigte sich eine Übereinstimmung in der Entwicklung der Gerinnungsparameter zwischen intem-Messung und extem-Messung, die vor allem zum Ende der Lagerung bedeutsam wird.

Um den Plättchenanteil an der Gerinnung zu evaluieren, wurde die fibtem-Messung durchgeführt. Hierbei sind die Plättchen durch Cytochalasin D gehemmt. Damit wird in erster Linie die Aktivität der plasmatischen Gerinnung beurteilt. Im Vergleich von extem- und fibtem-Messung ist somit der Beitrag der Plättchen zur Gerinnung zu erkennen.

Die CFT und der alpha-Winkel nahmen in der fibtem-Messung zwischen Tag null und Tag sieben signifikant ab. Es findet demzufolge ein langsamerer Ablauf der Gerinnung statt. Die MCF fiel schon zum vierten Tag signifikant. Erneut fanden sich Veränderungen, die für eine abnehmende Gerinnungsleistung bei längerer Lagerungsdauer sprechen.

Besonders interessant war für uns die Frage, wie der Einfluss der Thrombozyten zu bewerten ist, da sie der uns am meisten interessierende Bestandteil der Konzentrate und der Hauptgrund für die Anwendung von TAK sind. Im Plasma enthaltene Faktoren wären auch in FFP enthalten.

Somit erhält der Vergleich von extem- und fibtem-Messung einen wichtigen Stellenwert. Die CFT, die ein Zeichen für die Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung ist, verhielt sich unterschiedlich. In der extem-Messung sank sie am Anfang und blieb dann konstant, in der fibtem-Messung stieg sie. Ohne Plättchen braucht die Gerinnung länger, um ein Gerinnsel von einer bestimmten Festigkeit zu erzeugen. Das entsprach unseren Erwartungen. Die MCF war bei der extem-Messung zum siebten Tag signifikant geringer, wohingegen bei inaktivierten Thrombozyten schon am vierten Tag eine Reduktion der MCF auftrat. Der alpha-Winkel nahm bei beiden Messungen zum siebten Tag ab. Insgesamt fand ohne den Plättcheneinfluss eine schnellere signifikante Veränderung der Parameter in Richtung einer verminderten Gerinnungsleistung statt. Das macht deutlich, dass auch über sieben Tage gelagerte Thrombozyten einen Einfluss auf den Gerinnungsablauf haben. Es ist jedoch fraglich, wie stark dieser ist.

Zusammenfassend zeigt die Rotationsthrombelastometrie eine Reduktion der Gerinnungsinitiierung und des -ablaufes mit einer geringeren Gerinnungsbildung der TAK im Verlauf der Lagerung, die bei sieben Tagen am deutlichsten wird.

Andere Studien mit der Rotationsthrombelastographie oder -metrie über die Eigenschaften von TAK während der Lagerung liefern unterschiedliche Ergebnisse. Die Arbeitsgruppe um Gutensohn stellte 2002 bei einem Vergleich von ein bis zwei bzw. drei bis fünf Tage gelagerten Konzentraten konstante Werte für CT, CFT und MCF fest (Gutensohn et al. 2002). Dies kann in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen gebracht werden, da wir hauptsächlich zum siebten Tag signifikante Veränderungen fanden. Bei Rock ist der Messzeitpunkt der fünfte Lagerungstag (Rock et al. 2006). Die Studie zeigt schon zum fünften Tag eine schlechtere Gerinnungsaktivierung, repräsentiert durch eine verlängerte CT und CFT (hier r und k). Dagegen bleibt die MCF konstant. Fraglich ist, ob eine Messung bei uns

am fünften Tag ähnliche Veränderungen ergeben hätte. Trotzdem zeigen die Ergebnisse mit einer Abnahme der Gerinnungsaktivität eine ähnliche Tendenz wie unsere Untersuchungen. Demgegenüber stehen Ergebnisse von Svendsen, die während der Lagerung über acht Tage eine konstante CT und MCF feststellt (Svendsen et al. 2007). Johansson kommt in einem Artikel zu dem Schluss, dass die CT kürzer wird, während die MCF über sieben Tage konstant bleibt (Johansson et al. 2008). Tynngård stellt eine konstante CT und verlängerte CFT fest (Tynngård, 2008).

Untersuchungen mit der Rotationsthrombelastometrie und -graphie ergeben ein uneinheitliches Bild von der Gerinnungsfähigkeit der Konzentrate im Verlauf der Lagerung. Eine wesentliche Ursache liegt in der unterschiedlichen Methodik der Studien begründet. So werden unterschiedliche Herstellungstechniken der TAK angewandt, die Untersuchungsmaterialien variieren und die Messzeitpunkte sind unterschiedlich.

Eine weitere Ursache für die Unterschiede können Streuungen der Messwerte sein. Dazu führte Lang Untersuchungen durch und stellte für die CT und CFT vor allem in der intern- und extern-Messung Streuungen fest (Lang et al. 2005). Die MCF unterlag hingegen geringen Streuungen. Die Gruppe um Lang verglich Ergebnisse von Citratblutproben von unterschiedlichen Zentren, um Referenzwerte für die Rotationsthrombelastometrie zu etablieren. Sie kam zu dem Schluss, dass durch die Aktivatoren und verbesserte Untersuchungsbedingungen der neuen ROTEM-Geräte ein Vergleich der Messwerte zwischen verschiedenen Zentren möglich ist.

In unserem Versuch wurden TAK untersucht. Dies ist in der Klinik unüblich. Aus diesem Grund existieren keine Referenzwerte. Ähnlich wie Lang beobachteten wir Streuungen der Messwerte. Dies betraf vor allem die CT. Gerade die Initiierung der Gerinnung war anfällig für Störfaktoren. Dennoch stellten wir zwischen den Messzeitpunkten signifikante Unterschiede fest. Die Veränderungen der TAK während der Lagerung waren

demzufolge so bedeutend, dass sie trotz Streuung signifikante Unterschiede verursachten.

Von Hänecke wurde ein Einfluss von Temperaturschwankungen und Luftströmen beschrieben (Hänecke und Klouche 2007). Allerdings benutzte man für die Versuche ein altes Modell des roTEG, das inzwischen durch Pentapharm stetig weiterentwickelt wurde. So ist das ROTEM wesentlich resistenter gegen Einflüsse aus der Umgebung (Ebinger 2008). Das ROTEM[®] delta, das wir verwendeten, ermöglichte durch die integrierte Heizung und direkten Kontakt zwischen Küvettenhalter und Gerät einen guten Schutz vor äußeren Veränderungen.

Auf einen wichtigen Aspekt wurde 1997 von McNulty hingewiesen (McNulty et al. 1997). Durch zwischenzeitliches schnelles Einfrieren von TAK wurden die Plättchen in ihrer Morphologie und Funktion durch Zerstörung der Membran beeinträchtigt. Die Parameter CT, CFT und MCF, die in einer Patientenvollblutspende mit einem Teil TAK gemischt und vermessen wurden, entwickelten sich im Vergleich mit unveränderten Vollblutspenden in Richtung einer verbesserten Gerinnung. Ähnliche Beobachtungen gab es bei nicht gefrorenen Plättchen. Trotz des Verlustes der Membranintegrität konnten prokoagulatorische Stimuli wirken. Das heißt, die Rotationsthrombelastometrie konnte hier nur unzureichend zwischen intakten und geschädigten Plättchen differenzieren.

Bei der Aktivierung der Plättchen, wie sie während der Lagerung auftritt, werden ebenfalls prokoagulatorische Signale generiert. Es stellt sich die Frage, ob es einen erkennbaren Unterschied zwischen aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten gibt. Eine Betrachtung der Ergebnisse der rotationsthrombelastometrischen Messungen bringt Aufschluss. Hier traten über die Lagerungsdauer von sieben Tagen Veränderungen auf, die durch eine Aktivierung verursacht waren und zu Unterschieden der Messparameter führten. Es ist allerdings möglich, dass auch aktivierte

Plättchen einen gerinnungsfördernden Beitrag leisteten und ohne diesen die Abnahme der Gerinnungsaktivität noch ausgeprägter wäre.

McNulty hat in seiner Studie Vollblut verwendet, das unverändert oder mit zwischenzeitlich gefrorenen oder frischen Plättchen versetzt war. Außerdem wurden keine Aktivatoren zur Initiierung des Gerinnungsablaufes verwendet. Zudem wurden die Messungen mit der Rotationsthrombelastographie durchgeführt. Es gibt damit vielfältige Unterschiede, die die verschiedenen Ergebnisse erklären können.

Die Messparameter der Rotationsthrombelastometrie korrelieren mit einigen weiteren Parametern. Ein Zusammenhang besteht zwischen MCF und der Plättchenzahl bzw. der Fibrinogenkonzentration (Kang et al. 1985). Da sich in unseren Versuchen die Thrombozytenkonzentration allerdings nicht signifikant änderte, müssen andere Ursachen als eine zahlenmäßige Abnahme der Thrombozyten für die Reduktion der Gerinnungsleistung, die durch die abnehmende MCF repräsentiert wurde, verantwortlich gewesen sein. Diese lagen am ehesten in einer Aktivierung der Thrombozyten begründet. Dadurch blieb zwar ihre Konzentration in den Proben konstant, aber ihre Fähigkeit prokoagulatorisch wirksam zu sein, nahm ab.

Wir werteten mehrere mögliche Einflussfaktoren auf die Rotationsthrombelastometrie aus.

Die Spendergruppe, deren Altersspanne von 26 bis 66 Jahren reichte, wurde in über und unter 40-jährige Probanden getrennt. Ein Vergleich der Messwerte ergab keinen Unterschied. Lediglich bei den älteren Spendern zeigte sich im fibtem-Test eine höhere Gerinnselfestigkeit. Der Grund dafür könnte in höheren Konzentrationen von Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen im Plasma älterer Probanden sein, wohingegen anti-koagulatorische Faktoren weniger ansteigen (Ajmani und Rifkind 1998, Javorschi et al. 1998). Diese generelle Hyperkoagulabilität im Alter spiegelt sich auch bei Untersuchungen mit der Rotationsthromb-

elastographie wider (Ng 2004). Auch Lang, der 2005 Referenzwerte für die Rotationsthrombelastometrie aufstellte, fand bei älteren Personen eine höhere Gerinnungsaktivität. Das zeigte sich bei den CFT- und MCF-Werten und war bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen (Lang et al. 2005). Diese durchgehende Tendenz zur Hyperkoagulabilität im Alter und daraus folgenden Veränderungen der ROTEM-Parameter konnten wir nicht feststellen. Der Grund hierfür könnte die im Vergleich zu Kwok und Lang junge Probandengruppe sein. Der größte Teil unserer Probanden fiel in Kwoks jüngste Vergleichsgruppe.

Als nächstes wurde der mögliche Einfluss des Geschlechts auf die ROTEM-Variablen bestimmt. Bei Frauen findet man einen Trend zur Hyperkoagulation, der sich in einem schnelleren Gerinnungsablauf und einer höheren Gerinnselfestigkeit widerspiegelt. In Studien von Gorton (Gorton et al. 2000) und Lang (Lang et al. 2005) zeigten Frauen bei den meisten Parametern signifikant höhere Gerinnungsaktivitäten. Als Grund dafür nimmt man die durch Sexualhormone höheren Konzentrationen von Fibrinogen und F VIII und niedrigere Spiegel von Protein S im Plasma an (Lowe et al. 1997). Diese Beobachtungen konnten wir nicht bestätigen. Ein Grund dafür könnte die kleine Probandengruppe von sieben Personen sein.

Die Apheresespender besaßen verschiedene Blutgruppen, zwischen denen es keine signifikanten Unterschiede bei den Messungen gab. Das heißt, dass eine TAK-Spende unabhängig von der Blutgruppe möglich ist.

Eine interessante Beobachtung ergab die Messung des Einflusses des Rhesusfaktors. Spender mit positivem Rhesusfaktor hatten in der fibtem-Messung niedrigere CFT-Werte und höhere alpha-Winkel. Beide Parameter geben einen Hinweis auf die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktionen, die bei positivem Rhesusfaktor höher ist. Allerdings war ähnlich wie bei den weiblichen Probanden die Verteilung sehr ungleichmäßig. Nur sechs

Spender hatten einen negativen Rhesusfaktor. Diese Gruppe ist zu klein, um Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit zu ziehen.

Die TAK waren in 21 Fällen Einzel- und in 26 Fällen Doppelkonzentrate. Auch wenn sich die Mittelwerte der TAK nicht signifikant unterschieden, haben wir einen möglichen Einfluss des Konzentrattyps untersucht. Es stellte sich kein signifikanter Unterschied dar. Doppelkonzentrate werden hergestellt, wenn der Spender in einer entsprechenden Zeit genügend Blutplättchen spenden kann. Voraussetzung dafür ist eine hohe Thrombozytenkonzentration im Blut. In unseren Untersuchungen zeigte sich dies auch an einer höheren Konzentration in den TAK am Tag null. Allerdings hatte diese weder am Tag null noch im Verlauf der Lagerung Einfluss auf die Messparameter. Somit sind sowohl Einzel- als auch Doppelkonzentratspenden für die Herstellung von TAK geeignet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass während der Lagerung Veränderungen der TAK auftreten. Unsere Studie zeigt hier vor allem bei einer Lagerung über sieben Tage ungewünschte Effekte.

6.3. Freisetzung von Mikrovesikeln während der Lagerung

Mikrovesikel sind Membranabschnürungen von Plättchen, Monozyten und Endothelzellen, die bei Gefäßzellaktivierung und Apoptose freigesetzt werden (Freysinnet 2003, Piccin et al. 2007). Ihre Funktionen sind vielfältig (Übersichtsartikel: Hugel et al. 2005).

Um die Veränderung in der Anzahl der Mikrovesikel während der Lagerung zu untersuchen, stellten wir Plasmaproben von jedem TAK an den Tagen null, vier und sieben her. Die Menge der Mikrovesikel stieg schon zwischen den Tagen null und vier signifikant an. Die Entwicklung setzte sich zum siebten Tag fort. Die gemessenen Mikrovesikel wurden von Thrombozyten freigesetzt, da ihre Membran das Glykoprotein IIb/IIIa enthält, gegen den der CD-61-Antikörper gerichtet ist. Unsere Untersuchung bestätigt die

Studien anderer Autoren an wesentlich kleineren Probandengruppen, dass eine zunehmende Lagerungsdauer mit einer ansteigenden Zahl an Mikrovesikeln verbunden ist (Keuren et al. 2006, Bode et al. 1991).

Die Freisetzung von Mikrovesikeln thrombozytären Ursprungs hat verschiedene Auslöser. Es werden kalziumabhängige und -unabhängige Mechanismen unterschieden. Agonisten wie Kollagen und Thrombin führen zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration. Dieses aktiviert Calpain, eine Protease, die Bestandteile des Membranskeletts spaltet (Basse et al. 1994, Fox et al. 1991). Außerdem hat das Kalzium eine direkte Wirkung auf Membranphospholipide. Es gelangt vermehrt PS in die äußere Membran, wodurch die Oberflächenspannung in der Membran zunimmt (Freysinnet 2003). Die Folge dieser Veränderungen ist die Abschnürung von Mikrovesikeln. Weitere kalziumunabhängige Wege wie die Phosphorylierung von Proteinen werden diskutiert (Yano et al. 1994). Auch hoher Scherstress führt zur Mikrovesikelbildung (Miyazaki et al. 1996).

Die auslösenden Faktoren für die Mikrovesikelbildung sind wesentlicher Teil der Plättchenaktivierung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung von Thrombozyten eine hervorragende Rolle bei der Mikrovesikelfreisetzung spielt und diese damit als Aktivierungsmarker genutzt werden können.

Mikrovesikel, die von Plättchen freigesetzt werden, sind diesen in funktioneller Hinsicht sehr ähnlich. Sie haben negative Phospholipide in ihrer äußeren Membran. Außerdem enthält diese GP IIb/IIIa, GP Ib (George et al. 1986), vWF und Thromboxan A2 sowie Thrombomodulin, TFPI und Protein C (Morel und Hoffman, 2006).

Dass auch Mikrovesikel einen prokoagulatorischen Effekt haben, zeigen Untersuchungen von Patienten, die eine hohe Konzentration an Mikrovesikeln, aber eine nur geringe Konzentration von Thrombozyten aufweisen und dennoch nicht bluten (Jy et al. 1992). Bei Erkrankungen, die mit Thrombosen einhergehen, ist die Konzentration der Mikrovesikel

häufig erhöht (Piccin et al. 2007). Umgekehrt führt ein Defekt der Mikrovesikelsynthese, wie er beim seltenen Castaman-Defekt besteht, trotz intakter Plättchen zu verlängerten Blutungszeiten (Castaman et al. 1997). Mikrovesikel sind *in vivo* ein wichtiger Teil der Hämostase. Somit muss ihr Auftreten in TAK nicht zwangsläufig zu einer Beeinträchtigung derselben führen.

Unklar ist allerdings, was mit den Mikrovesikeln der TAK nach der Transfusion geschieht und inwieweit sie einen Beitrag zur Verbesserung der Gerinnungssituation leisten können. Die Clearance der Mikrovesikel wird wahrscheinlich durch ihre Oberflächenbeschaffenheit bestimmt. So führt die Expression von PS an der äußeren Membran (Schlegel und Williamson 2001) ebenso wie die Opsonierung z. B. durch Komplementfaktoren (Flaumenhaft 2006) zu einem Abbau. Flaumenhaft erwähnt zusätzlich die Clearance durch zirkulierende Phospholipasen wie Phospholipase A2. Bei der Infusion von Mikrovesikeln in Mäuse waren diese schon dreißig Minuten danach aus der Zirkulation entfernt (Flaumenhaft 2006). Ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist unklar.

In unseren Versuchen war eine Clearance der Mikrovesikel durch das geschlossene System nicht möglich. Trotz Mikrovesikelfreisetzung mit prokoagulatorischem Potential sank die Gerinnungsleistung der TAK. Es ist wahrscheinlich, dass die Beeinträchtigung der Plättchen während der Lagerung eine stärkere Auswirkung auf die Gerinnung hatte als das prokoagulatorische Potential der Mikrovesikel. Damit leisten Mikrovesikel bei der Transfusion von gelagerten TAK wahrscheinlich nur einen geringen Beitrag zur Verbesserung der Gerinnungssituation des Patienten. Im Gegenteil zeigen sie eine Aktivierung von Plättchen in den TAK, die unerwünscht ist und für eine Reduktion der Gerinnungsfähigkeit spricht.

6.4. Diskussion der Thrombinbildung

Thrombin ist für eine erfolgreiche Thrombenbildung unerlässlich. Sowohl der klassische extrinsische als auch der intrinsische Weg der Gerinnungsaktivierung gipfeln in der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, das Fibrinogen spaltet sowie Faktor XIII und Thrombozyten aktiviert. Deshalb kann eine Untersuchung der Thrombinbildung Aufschlüsse über die Gerinnungssituation des Patienten geben. Eine Methode dafür ist der TGA. Er wird zur Untersuchung von plättchenarmen und -reichen Plasma eingesetzt und dient der Überwachung einer FVIII-Inhibitor-Therapie oder Antikoagulation. Außerdem kann der Assay zur Hämophiliediagnostik und Untersuchung der Thrombinbildung durch Mikropartikel eingesetzt werden (Kaufmann et al. 2005).

Wir untersuchten Plasmaproben der TAK von den Tagen null, vier und sieben auf ihre Fähigkeit Thrombin zu generieren. Die Zeit bis zum Auftreten eines Gerinnsels (lag-time) nahm ab, die Geschwindigkeit und die Gesamtmenge an Thrombin nahmen zum siebten Tag zu. Allerdings waren die Veränderungen nicht signifikant. Das Maximum der Thrombinbildung (peak-thrombin) und die Zeit bis dahin (peak-time) veränderten sich nur geringfügig.

Das untersuchte Material enthielt keine Thrombozyten. Allerdings waren Mikrovesikel und Gerinnungsfaktoren im Plasma enthalten. Wie Vanschoonbeck feststellte, reichen schon PS-tragende Phospholipide aus, um eine Thrombinbildung zu triggern (Vanschoonbeck et al. 2004). Da Mikrovesikel diese enthalten, können sie auch ohne Plättchen eine Thrombinbildung bewirken (Berckmans et al. 2001). Eine weitere gerinnungsfördernde Eigenschaft von etwa 10% der Mikrovesikel ist das Vorhandensein von TF in der Membran, der aber *in vivo* schnell durch TFPI inaktiviert wird (Keuren et al. 2006). Bei uns trat er durch die Aktivierung mit TF in den Hintergrund. Übereinstimmend mit der schon am nullten Tag

vorhandenen beträchtlichen Mikrovesikelzahl, fanden wir auch am ersten Messzeitpunkt eine erhebliche Thrombinbildung. Eine Zunahme der Mikrovesikelmenge ist mit einer Verkürzung der lag-time (Bidot et al. 2008), einem Anstieg des peak-thrombins und Gesamtthrombins (Lawrie et al. 2008, Trappenburg et al. 2009) und einer erhöhten maximalen Thrombinbildungsgeschwindigkeit (Keuren et al. 2006) verbunden. Diese Beobachtungen können wir nicht bestätigen. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass die Ursache für erhöhte Konzentrationen an Mikrovesikeln der anderen Studien zumeist zu Thrombose neigende Erkrankungen waren (Trappenburg, Bidot). Das heißt, die Mikrovesikelbildung fand in pathologischen Situationen statt, die andere Eigenschaften der Mikrovesikel bedingen können. Lawrie untersuchte Fresh Frozen Plasma, das hauptsächlich Mikrovesikel von Erythrozyten enthielt. In unseren Versuchen liegt die Ursache der höheren Mikrovesikelanzahl an der Produktion und Lagerung der TAK. Dies gleicht am ehesten Keurens Untersuchungsbedingungen, jedoch verwendete Keuren nur gewaschene Mikrovesikel. Bei uns waren die Plättchen durch Zentrifugation aus den Konzentraten entfernt worden. Damit können die Mikrovesikel unterschiedliche Eigenschaften mit Einschränkung der Funktionsfähigkeit während der Lagerung aufweisen, die durch die Behandlung bei Keuren nicht zum Tragen kam. Andererseits kann bei uns das Plasma als Lagerungsmedium einen Einfluss gehabt haben. Es ist durchaus denkbar, dass während der Lagerung Veränderungen stattfanden, die trotz einer höheren Anzahl an Mikrovesikeln eine Einschränkung der Thrombinbildung zur Folge hatten. Diese können in der Aktivierung der Thrombozyten während der Lagerung der TAK begründet sein. Dabei degranulieren Plättchen und führen so zu Veränderungen im Plasma. Zudem werden TAK bei 22°C gelagert. Dies ist die optimale Lagerungstemperatur für Thrombozyten, aber nicht für Plasma, das bei -30°C tiefgefroren wird. Dadurch sind mit der Lagerung assoziierte Veränderungen der Konzentration von Gerinnungsfaktoren möglich. Allerdings bewegen sich

die notwendigen Konzentrationen der Faktoren für den Gerinnungsablauf zumeist in einer weiten Spanne (Allen et al. 2004). Damit sind Schwankungen in der Konzentration während der Lagerung insgesamt vermutlich zu gering, um einen wesentlichen Einfluss auf die Gerinnungsbildung zu haben.

Das Plasma als Lagerungsmedium der Thrombozyten führte zu einer konstanten Thrombinbildung und zeigte sich damit unverändert in seinen Eigenschaften. Es ermöglichte gleichbleibende Lagerungsbedingungen. Daraus folgt, dass die Thrombozyten der TAK der wesentliche Faktor für Veränderungen während der Lagerung waren.

7 Schlussfolgerung

Die Qualität der TAK verändert sich während der Lagerung. Prokoagulatorische Fähigkeiten nehmen ganz besonders bei einer Verlängerung der Lagerungsdauer auf sieben Tage ab. Dies zeigt sich in den rotationsthrombelastometrischen Messungen, die einen Globaltest der Gerinnung darstellen. Diese Veränderungen sind im Wesentlichen auf Veränderungen der Thrombozyten zurückzuführen. Hierfür kommt als wahrscheinlichster Mechanismus eine Aktivierung in Betracht. Dafür spricht auch der Anstieg der Mikrovesikelkonzentration. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Thrombinbildung in den Plasmaproben der gelagerten TAK nachweisen. Dass heißt, dass das Plasma als Lagerungsmedium unverändert ist und gleichbleibende Lagerungsbedingungen ermöglicht.

Insgesamt muss ein Balanceakt stattfinden. Einerseits sollen die TAK aus wirtschaftlichen Gründen so vollständig wie möglich genutzt werden. Dennoch muss ihre Qualität auf einem hohen Niveau bleiben. Unsere Studie zeigt, dass während der Lagerung eine Abnahme der Gerinnungsfähigkeit stattfindet. Sie ist am Anfang gering und in den meisten Fällen erst bei einer Lagerung über sieben Tage signifikant. Vor allem länger gelagerte Plättchen haben damit eine reduzierte Fähigkeit einen Beitrag zur Koagulation zu leisten. Allerdings ist die prokoagulatorische Fähigkeit der Thrombozyten aus den TAK nicht vollständig erloschen.

Es stellt sich die Frage, wie die gelagerten Thrombozyten die Koagulation *in vivo* beeinflussen. Es gibt Studien zur Wiederfindungsrate (recovery) und Überlebenszeit (survival) von Thrombozyten aus TAK, die im Vergleich zu frischen TAK eine Reduktion zeigen (AuBuchon et al. 2005, Shanwell et al. 2006, Slichter et al. 2006). Die Überlebenszeit nach

Transfusion hat in der Lebensdauer eines Thrombozyten von zehn Tagen eine natürliche Grenze. Die Ergebnisse von Recovery und Survival bewegen sich im als sinnvoll angesehenen Rahmen (Murphy 2004).

Allerdings ist das Vorhandensein von Thrombozyten nicht notwendigerweise mit einer intakten Funktionsfähigkeit verknüpft. Unsere Studie zeigt eine Beeinträchtigung *in vitro*, die vor allem bei längerer Lagerung wirksam wird. Ob Patienten während Versorgungsengpässen und unter Ausschluss bakterieller Kontamination von einer Transfusion länger gelagerter TAK mit ihren Veränderungen profitieren, ist fraglich. Interessant wäre es herauszufinden, in welchen Parametern sich die Beeinträchtigung der Thrombozyten *in vivo* niederschlägt.

Für einen optimalen Effekt beim Patienten sollten nach unseren Untersuchungen nur TAK bis zu einer Lagerungsdauer von vier Tagen genutzt werden.

8 Literaturverzeichnis

Ajmani RS, Rifkind JM. 1998. Hemorheological changes during human aging. *Gerontology*, 44(2): 111-120.

Allen GA et al. 2004. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *J Thromb Haemost* 2(3): 402-413.

AuBuchon JP et al. 2005. Further evaluation of a new standard of efficacy for stored platelets. *Transfusion* 45(7): 1143-1150.

Basse F et al. 1994. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochim Biophys Acta* 1190(2): 217-224.

Berckmans RJ et al. 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 85(4): 639-646.

Berndt MC et al. 2001. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 86(1): 178-188.

Bidot L et al. 2008. Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost* 6(6): 913-919.

Blajchman MA et al. 2005. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med Rev* 19(4): 259-272.

Bode AP et al. 1991. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood* 77(4): 887-895.

Bode W. 2006. The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost* 32 Suppl 1: 16-31.

Boomgaard MN et al. 1994. The platelet adhesion capacity to subendothelial matrix and collagen in a flow model during storage of platelet concentrates for 7 days [Abstract]. *Thromb Haemost*. 1994 Oct;72(4):611-6.

Cammerer U et al. 2003. The predictive value of modified computerized thromboelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery. *Anesth Analg* 96(1): 51-57.

Cardigan R, Williamson LM. 2003. The quality of platelets after storage for 7 days. *Transfus Med* 13(4): 173-187.

Castaman G et al. 1997. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol* 96(3): 458-463.

Cauwenberghs S et al. 2007. Hemostatic and signaling functions of transfused platelets. *Transfus Med Rev* 21(4): 287-294.

Cerutti E et al. 2004. Thromboelastogram monitoring in the perioperative period of hepatectomy for adult living liver donation. *Liver Transpl* 10(2): 289-294.

Clemetson KJ, Clemetson JM. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86(1): 189-197.

Comfurius P et al. 1990. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Jul 24;1026(2):153-60.

Curvers J et al. 2004. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion* 44(1): 49-58.

Dahlbäck B. 2005. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 257(3): 209-223.

Dahlbäck B. 2008. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 112(1): 19-27.

Davie EW, Ratnoff OD. 1964. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 145: 1310-1312.

Drake TA et al. 1989. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134(5): 1087-1097.

Dreier J et al. 2008. Sterility screening of platelet concentrates: questioning the optimal test strategy. *Vox Sang* 95(3): 181-188.

Dumont LJ et al. 2002. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion* 42(7): 847-854.

Ebinger T. 2008. Concerning Hänecke P, Klouche M: Thrombelastography Today: Practicability and Analytical Power. *Transfus Med Hemother* 2007;34:421–428. *Transfus Med Hemother* 2008;35:324–326.

Farndale RW et al. 2004. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2(4): 561-573.

Fay PJ. 2004. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* 18(1): 1-15.

Ferrer F et al. 2000. Evaluation of pooled platelet concentrates using prestorage versus poststorage WBC reduction: impact of filtration timing. *Transfusion* 40(7): 781-788.

Flaumenhaft R. 2006. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 182-187.

Fox JE 2001. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost* 86(1): 198-213.

Fox JE et al. 1991. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem* 266(20): 13289-13295.

Freyssinet JM 2003. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 1(7): 1655-1662.

Freyssinet JM, Toti F. 2010. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res* 125 Suppl 1: S46-48.

Friedmann AM et al. 2002. Do basic laboratory tests or clinical observations predict bleeding in thrombocytopenic oncology patients? A reevaluation of prophylactic platelet transfusions. *Transfus Med Rev* 16(1): 34-45.

Gailani D, Renné T. 2007. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1106–12.

George JN et al. 1986. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 78(2): 340-348.

Görlinger K et al. 2008. Messung der Thrombozytenfunktion mit Point-of-Care-Methoden. *Herz* 33(4): 297-305.

Gorton HJ et al. 2000. Thromboelastography identifies sex-related differences in coagulation. *Anesth Analg* 91(5): 1279-1281.

Gottumukkala VN et al. 1999. Assessing platelet and fibrinogen contribution to clot strength using modified thromboelastography in pregnant women. *Anesth Analg* 89(6): 1453-1455.

Gulliksson H. 2003. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev* 17(3): 209-215.

Gutensohn K et al. 2002. Platelet function testing in apheresis products: flow cytometric, resonance thrombographic (RTG) and rotational thrombelastographic (roTEG) analyses. *Transfus Apher Sci* 26(3): 147-155.

Hänecke P, Klouche M. 2007. Thrombelastography Today: Practicability and Analytical Power. *Transfus Med Hemother* 2007;34:421-428.

Harrison P, Cramer EM. 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7(1): 52-62.

Hartert H. 1951. Die Thrombelastography. *Z Gesamte Exp Med* 117(2): 189-203.

Heal JM, Blumberg N. 2004. Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood Rev* 18(3): 149-165.

Heemskerk JW et al. 2002. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88(2): 186-193.

Holme S et al. 1997. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 37(1): 12-17.

Huang JN, Koerper MA. 2008. Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia* 14(6): 1164-1169.

Hugel M et al. 2005. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* 20: 22-27.

Javorschi S et al. 1998. Relative influence of age and thrombotic history on hemostatic parameters. *Thromb Res* 91(5): 241-248.

Johansson PI et al. 2008. Investigation of the thrombin-generating capacity, evaluated by thrombogram, and clot formation evaluated by

thrombelastography of platelets stored in the blood bank for up to 7 days. Vox Sang 94(2): 113-118.

Jy W et al. 1992. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias [Abstract]. J Lab Clin Med 119(4): 334-345.

Kang Y et al. 1985. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. Anesth Analg 64(9): 888-896.

Kaufmann V et al. 2005. TECHNOTHROMBIN® TGA a novel Thrombin Generation Assay suitable for the new routine coagulation analyzer Ceveron® alpha. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2005; Volume 3, Supplement 1: abstract number.

Kehrel BE. 2003. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. Hämostaseologie 23(4): 149-158.

Keuren JF et al. 2006. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. Br J Haematol 134(3): 307-313.

Kiefel V. 2003. Immunologische Diagnostik bei Thrombozytopenie. Dtsch Arztebl 2003; 100:A 2159-2165 [Heft 33].

Lai M et al. 2002. Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences between the platelets collected with different cell separators. Transfus Apher Sci 27(3): 239-245.

Lang T et al. 2005. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. Blood Coagul Fibrinolysis 16(4): 301-310.

Lawrie AS et al. 2008. The characterization and impact of microparticles on haemostasis within fresh-frozen plasma. Vox Sang 95(3): 197-204.

Leytin V et al. 2004. Role of platelet surface glycoprotein Iba1 and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. Transfusion 44(10): 1487-1495.

Lippi G et al. 2009. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. Semin Thromb Hemost 35(1): 9-22.

Lowe GD et al. 1997. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative

reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol* 97(4): 775-784.

Lozano ML et al. 1997. Loss of high-affinity thrombin receptors during platelet concentrate storage impairs the reactivity of platelets to thrombin. *Transfusion* 37(4): 368-375.

Macfarlane RG. 1964. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 202: 498-499.

Maugeri N et al. 2009. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β_2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 113(21): 5254-5265.

McNulty SE et al. 1997. Platelet concentrate effects on thromboelastography. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11(7): 828-830.

Merten M et al. 1999. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 99(19): 2577-2582.

Metcalfe P et al. 1997. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 98(1): 86-95.

Miyazaki Y et al. 1996. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 88(9): 3456-3464.

Monroe DM, Hoffman M. 2006. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1): 41-48.

Monroe DM et al. 2002. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(9): 1381-1389.

Morgenstern E. 2010. Thrombozytenmorphologie in: Pötzsch B und Madlener K. 2010. Hämostaseologie. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 15-28.

Müller TH et al. 2006. Methods for the detection of bacterial contamination in blood products. *J Lab Med* 2006;30(2):74-90.

Müller-Eckardt C und Kiefel V Hrsg. 2003. Transfusionsmedizin. 3. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.

Murphy S et al. 1970. Storage of Platelet Concentrates at 22°C. *Blood* 1970; 35 (4): 549-557.

Murphy S. 2004. Radiolabeling of PLTs to assess viability: a proposal for a standard. *Transfusion* 2004;44:131-133.

Ng KF. 2004. Changes in thrombelastograph variables associated with aging. *Anesth Analg*. 2004 Aug;99(2):449-54.

Oliver JA et al. 1999. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1): 170-177.

Panes O et al. 2007. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 109(12): 5242-5250.

Payrastre B et al. 2000. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol* 60(8): 1069-1074.

Piccin A et al. 2007. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21(3): 157-171.

Reinhöfer et al. 2008. The value of rotation thromboelastometry to monitor disturbed perioperative haemostasis and bleeding risk in patients with cardiopulmonary bypass. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19:212-219.

Renné T et al. 2005. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202(2): 271-281.

Rinder HM, Ault KA. (1998). Platelet activation and its detection during the preparation of platelets for transfusion. *Transfus Med Rev* 12(4): 271-287.

Rock G et al. 2006. New methods showing in vitro changes of platelets. *Transfus Apher Sci* 35(2): 145-149.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100(12): 1673-1685.

Savage B et al. 1992. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 267(16): 11300-11306.

Schlegel RA, Williamson P. 2001. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8(6): 551-563.

Seghatchian J, de Sousa G. 2006. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci* 35(3): 189-196.

Shanwell A et al. 2006. Paired in vitro and in vivo comparison of apheresis platelet concentrates stored in platelet additive solution for 1 versus 7 days. *Transfusion* 46(6): 973-979.

Simon TL et al. 1983. Extension of platelet concentrate storage. *Transfusion* 23(3):207-12.

Slichter SJ et al. 2006. Viability and function of 8-day-stored apheresis platelets. *Transfusion* 46(10): 1763-1769.

Sorensen B, Ingerslev J. 2005. Tailoring haemostatic treatment to patient requirements - an update on monitoring haemostatic response using thrombelastography. *Haemophilia* 11 Suppl 1: 1-6.

Spalding GJ et al. 2007. Bedside-Thrombelastographie: Kostenreduktion in der Herzchirurgie. *Anaesthesist* 56(8): 765-771.

Spiess BD et al. 1995. Changes in transfusion therapy and reexploration rate after institution of a blood management program in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 9(2): 168-173.

Svendsen MS et al. 2007. Impairment of the hemostatic potential of platelets during storage as evaluated by flow cytometry, thrombin generation, and thrombelastography under conditions promoting formation of coated platelets. *Transfusion* 47(11): 2057-2065.

Thon JN, Devine DV. 2007. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets. *Transfusion* 47(12): 2260-2270.

Thon JN et al. 2008. Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* 22(4): 268-279.

Trappenburg MC et al. 2009. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* 94(7): 911-918.

Tynngård N et al. 2008. The quality of platelet concentrates produced by COBE Spectra and Trima Accel cell separators during storage for 7 days as assessed by in vitro methods. *Transfusion* 48(4): 715-722.

Vanschoonbeek K et al. 2004. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma:

subject-dependent variation in thrombogram characteristics. J Thromb Haemost 2(3): 476-484.

Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats Hrsg. 2008. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. Aufl.

Vorstand der Bundesärztekammer Hrsg. 2010. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) Vorabinformation.

Yano Y et al. 1994. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. Biochem J 299 (Pt 1): 303-308.

9 Anhang

Lebenslauf

Geburtsdatum 10.12.1982

Geburtsort Greifswald

Schulische Ausbildung

1989-1995 Käthe-Kollwitz-Schule, Greifswald

1995-2002 Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium, Greifswald

Abitur Juli 2002

2002-2003 Freiwilliges Soziales Jahr, Kassel

Studium

Seit Oktober 2003 Humanmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

September 2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Jena

Jena, 20.07.2010

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Dr. rer. nat. Volker Oberle
- Univ.-Prof. Dr. Dagmar Barz
- Dr. rer. nat. Mario Walther

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 20.07.2010

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dagmar Barz für die Überlassung des Themas und die geduldige Unterstützung über die gesamte Zeit des Werdens dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Volker Oberle möchte ich danke sagen für die stets freundliche Betreuung, die Anregungen und die netten Gespräche nicht nur fachlicher Natur.

Ich möchte mich herzlich bei den Mitarbeitern der Blutspende Jena, ganz besonders OA Dr. med. Thomas Lorenzen bedanken. Auch im HLA-Labor standen mir die Mitarbeiter sehr hilfreich und freundlich zur Seite. Herzlichen Dank.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern Birgit und Martin Friedrich, meiner Schwester Karin und meinem Bruder Hannes. Danke für eure Liebe, ermutigenden Worte und Gesten.

Was wäre ein Mensch ohne seinen „Kraftkreis“? Danke euch Mädels.

Lobe den Herrn, meine Seele, und vergiss nicht,
was er dir Gutes getan hat.

Psalm 103,2